

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

WELTOORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



BD

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/12, C07K 14/495, A61K 38/18		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/03188 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 30. Januar 1997 (30.01.97)
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/03065</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 12. Juli 1996 (12.07.96)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 195 25 416.3 12. Juli 1995 (12.07.95) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BIO-PHARM GESELLSCHAFT ZUR BIOTECHNOLOGISCHEN ENTWICKLUNG VON PHARMAKA MBH [DE/DE]; Czemyring 22, D-69115 Heidelberg (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HÖTTEN, Gertrud [DE/DE]; Weihwiesenweg 17, D-69245 Bammental (DE). POHL, Jens [DE/DE]; Kellerswiesen 3, D-76707 Hambrücken (DE). BECHTOLD, Rolf [DE/DE]; Carl-Zuckmayer-Strasse 21, D-69126 Heidelberg (DE). PAULISTA, Michael [DE/DE]; Wingerstrasse 10, D-69181 Leimen (DE). UNSICKER, Klaus [DE/DE]; Köpfelweg 54, D-69118 Heidelberg (DE).</p> <p>(74) Anwälte: WEICKMANN, H., Fincke usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO Patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Ohne internationalem Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>	
<p>(54) Title: USE OF MP52 OR MP121 FOR TREATING AND PREVENTING DISEASES OF THE NERVOUS SYSTEM</p> <p>(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON MP52 ODER MP121 ZUR BEHANDLUNG UND PRÄVENTION VON ERKRANKUNGEN DES NERVENSYSTEMS</p> <p>(57) Abstract</p> <p>Disclosed is the use of biologically active MP52 and/or MP121 for treating and preventing diseases of the nervous system and/or for treating neuropathological states caused by ageing of the nervous system. The disclosed medicament for treating and preventing diseases of the nervous system and/or for treating neuropathological states caused by ageing of the nervous system therefore contains biologically active MP52 and/or MP121 as active substances.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von biologisch aktivem MP52 oder/und MP121 zur Behandlung und Prävention von Erkrankungen des Nervensystems oder/und zur Behandlung neuropathologischer Situationen, die durch Alterung des Nervensystems verursacht sind. Ein erfundungsgemäßes Arzneimittel zur Behandlung und Prävention von Erkrankungen des Nervensystems oder/und zur Behandlung neuropathologischer Situationen, die durch Alterung des Nervensystems verursacht sind, enthält daher biologisch aktiven MP52 oder/und MP121 als Wirkstoff.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Letland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldan	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

- 1 -

Verwendung von MP52 oder MP121 zur Behandlung und Prävention von Erkrankungen des Nervensystems

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von MP52 oder/und MP121, zweier Wachstums- oder/und Differenzierungsfaktoren der TGF- β -Superfamilie zur Behandlung und Prävention von Erkrankungen des Nervensystems oder/und zur Behandlung neuropathologischer Situationen, die durch Alterung des Nervensystems verursacht sind. Darüber hinaus betrifft die Erfindung Arzneimittel zur Behandlung oder Prävention obiger Indikationen, welche MP52 oder/und MP121 enthalten.

Viele Wachstumsfaktoren aus der TGF- β -Superfamilie (Kingsley, Genes & Development 8, 133-146 (1994) und die darin zitierte Literatur) sind für einen weiten Bereich medizinischer Behandlungsmethoden und Anwendungen, die insbesondere Wundheilung und Gewebewiederherstellung betreffen, relevant. Zu diesen zählen insbesondere Mitglieder der TGF- β (Transforming Growth Factor, siehe z.B. Roberts und Sporn, Handbook of Experimental Pharmacology 95 (1990), S. 419-472, eds. Sporn und Roberts), der BMP (Bone Morphogenetic Protein, siehe z.B. Rosen und Thies, Growth Factors in Perinatal Development (1993), S. 39-58, eds. Tsang, Lemons und Balistreri) und der Inhibin/Aktivin (siehe z.B. Vale et al., The Physiology of Reproduction, Second Edition, (1994), S. 1861-1878, eds. Knobil und Neill) Familie. Obwohl die Mitglieder dieser Familie im reifen Anteil hohe Aminosäurehomologien, insbesondere zumeist 7 konservierte Cysteine aufweisen, zeigen sie erhebliche Variationen in ihren genauen Funktionen. Die TGF- β -ähnlichen Proteine gehören zu einer strukturellen Superfamilie, die alle ein Cystine Knot Motif aufweisen (Cell, Vol. 73 (1993), S. 421-424). Weitere Mitglieder dieser Superfamilie sind Proteine aus der NGF (Nerve Growth Factor)-/Neurotrophin-Familie und PDGF (Platelet Derived Growth Factor)-Familie. Häufig zeigen einzelne Wachstumsfaktoren mehrere Funktionen gleichzeitig, so daß ihre Anwendung bei verschiedenen medizinischen Indikationen von Interesse ist.

- 2 -

Einige dieser multifunktionellen Proteine zeigen neben Funktionen wie z.B. Regulation der Proliferation und Differenzierung bei vielen Zelltypen (Roberts und Sporn, *Handbook of Experimental Pharmacology* 95 (1990), S. 419-472, eds. Sporn und Roberts; Sakurai et al., *J. Biol. Chem.* 269 (1994), S. 14118-14122) auch überlebensfördernde Effekte bei Neuronen. So wurden z.B. für TGF- β trophische Effekte auf embryonalen motorischen und sensorischen Neuronen *in vitro* nachgewiesen (Martinou et al., *Devl. Brain Res.* 52, S. 175-181 (1990) und 10 Chalazonitis et al., *Dev. Biol.* 152, S. 121-132 (1992)). Weiterhin wurden für die Proteine TGF- β -1, -2, -3, Aktivin A und GDNF (Glial cell line-derived neurotrophic factor), ein Protein, das strukturelle Ähnlichkeiten zu TGF- β -Superfamilienmitgliedern aufweist, überlebensfördernde Effekte auf dopaminerige Neurone des Mittelhirns nachgewiesen, wobei dieser Effekt nicht über Astrozyten vermittelt wurde (Kriegstein et al., *EMBO J.* 14, S. 736-742 (1995)).

WO 93/16099, WO 95/04819 und WO96/01316 offenbaren die DNA- 20 und Protein-Sequenzen von TGF- β ähnlichen Proteinen, insbesondere von MP52 und MP121. In WO 95/04819 wird für MP52 ein knorpel- und knocheninduzierendes Potential offenbart.

Das Auftreten von Proteinen der TGF- β -Superfamilie in unterschiedlichen Gewebestufen und Entwicklungsstufen ist in Übereinstimmung mit Unterschieden hinsichtlich genauer Funktionen, sowie Zielorte, Lebensdauer, Erfordernisse für Hilfsfaktoren, erforderliche zelluläre physiologische Umgebung und/oder Beständigkeit gegen Abbau.

30

Die der vorliegenden Erfindung zu Grunde liegende Aufgabe besteht darin, ein Protein bereitzustellen, das eine Behandlung oder Prävention von Krankheiten des Nervensystems ermöglicht. Von Interesse sind die Behandlung von Störungen oder 35 Verlusten nervöser Funktionen. Diese können hervorgerufen werden durch akute pathologische Zustände wie bei zerebrovaskulären, entzündlichen, infektiösen, stoffwechselartigen Män-

- 3 -

geln oder/und Mängeln hervorgerufen durch toxische Einflüsse, Verletzungen, Tumorwachstum oder operative Eingriffe. Weiterhin können Störungen oder Verluste nervöser Funktionen verursacht sein durch chronische pathologische Zustände wie vorzugsweise neurodegenerative Erkrankungen. Neuropathologische Situationen werden häufig auch durch Alterung des Nervensystems verursacht.

Diese Aufgabe wird gelöst durch die Verwendung von biologisch aktivem MP52 oder/und MP121 zur Behandlung oder/und Prävention von Erkrankungen des Nervensystems oder/und zur Behandlung neuropathologischer Situationen, die durch Alterung des Nervensystems verursacht sind.

Mit der vorliegenden Erfindung konnte gezeigt werden, daß MP52 einen positiven Einfluß auf das Überleben von dopaminergen Neuronen aufweist (siehe Figur 3). Dieser Einfluß wird jedoch abweichend von TGF-ßs und Aktivin A zumindest teilweise über die mit Nervenzellen assoziierten Astrozyten vermittelt (siehe Figur 4). Somit ist MP52 nützlich bei der Behandlung oder Prävention von Krankheiten des Nervensystems, insbesondere Erkrankungen, die das Gehirn betreffen. Von besonderem Interesse sind hierbei neurodegenerative Erkrankungen wie z.B. die Parkinson'sche Krankheit, möglicherweise auch Krankheiten wie Alzheimer oder Huntington Chorea. Des Weiteren gelingt es unter Verwendung von MP52 das Überleben von Neuronen zu fördern und damit eine Aufrechterhaltung nervöser Funktionen zu bewirken. Alle Anwendungsmöglichkeiten bestehen sowohl bei akuten als auch bei chronisch pathologischen Zuständen, auch die Vorbeugmaßnahmen. Als akute pathologische Zustände sind dabei vorzugsweise zerebrovaskuläre, entzündliche, infektiöse, stoffwechselartige Mängelerscheinungen oder/und Mängel, hervorgerufen durch toxische Einflüsse, Verletzungen, Tumorwachstum oder operative Eingriffe zu nennen.

35

Ein im Rahmen der Erfindung behandelbarer chronischer pathologischer Zustand ist z.B. eine neurodegenerative Erkrankung.

- 4 -

Mit der vorliegenden Erfindung konnte weiterhin gezeigt werden, daß MP52 einen stimulierenden Einfluß auch auf Neurone der Retina hat. Während der Entwicklung des visuellen Systems wandern die Axone aus den Ganglionzellen der Retina zu speziellen Regionen im Gehirn. Es konnte durch mehrere Gruppen gezeigt werden, daß lösliche Faktoren, die aus visuellen Bereichen des Gehirns isoliert wurden, die Ganglionzellen in der Retina stimulieren können (Nurcombe, V. und Bennett, M.R., *Exp. Brain Res.* 44, 249-258 (1981), Hyndman, A.G., Adler, R., *Dev. Neurosci.* 5, 40-53 (1982), Turner, J.E. et al., *Dev. Brain Res.* 6, 77-83 (1983), Carri, N.G. und Ebendal, T., *Dev. Brain Res.* 6, 219-229 (1983)). Die Bildung von Nervenfaserbündeln, welche wahrscheinlich optische Axone sind, die von Ganglionzellen der Retina ausgehen, hängt von neurotrophinen Faktoren ab.

Versuche mit MP52 zeigten, daß dieses Protein auch als ein neurotropher Faktor in diesem System wirken kann.

So konnte an frisch isolierten Gewebekulturen von embryonaler Retina aus Hühnern gezeigt werden, daß MP52 das Auswachsen von Nervenfasern signifikant fördert (siehe hierzu Figur 6 und Tabelle 1).

Während dieser Experimente konnte auch gezeigt werden, daß weitere Mitglieder der TGF- β -Familie ebenfalls eine stimulierende Wirkung haben. Dazu zählt insbesondere auch der MP121 (WO93/16099 und WO96/01316), der eine etwa gleich starke Wirkung wie der MP52 aufweist (siehe hierzu Figur 6 und Tabelle 2).

Die Aktivitäten von MP52 und MP121 können für die Heilung von Erkrankungen am Auge, insbesondere der Retina und des Sehnervs verwendet werden. Hervorzuheben sind hier insbesondere auch die Behandlung von Verletzungen der neuronalen Schicht der Retina und des Sehnervs. Derartige Verletzungen könnten z.B. durch Unfälle, Entzündungen oder Durchblutungsstörungen her-

- 5 -

vorgerufen werden. Anwendungen bei Netzhauttransplantationen sind ebenfalls von Vorteil. Weiterhin sollte aber auch eine Heilung oder Linderung von Verletzungen an anderen Hirnnerven von Bedeutung sein. Hervorzuheben ist hier z.B. der Trigeminus 5 (Nervus Trigeminus), der auch Teile des Auges innerviert. So können Mitglieder der TGF- β -Familie, insbesondere der MP52 und der MP121, auch Anwendung bei Hornhauttransplantationen finden. Das Anwachsen der Hornhaut wird auch durch die nervale Versorgung beeinflußt. Denkbar ist ein Einsatz auch bei nur 10 segmentalen Schäden der Hornhaut, wie sie z.B. bei Herpesinfektionen im Auge auftreten.

Insbesondere die Anwendung bei degenerierenden Erkrankungen der Augenoberfläche sind hervorzuheben.

15

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung verwendet man als biologisch aktiven MP52

- (a) den reifen Anteil und gegebenenfalls weitere funktionelle Anteile der in SEQ ID NO.1 gezeigten Proteinsequenz;
- 20 (b) Teile des reifen Proteins, die im wesentlichen dieselbe Aktivität aufweisen;
- (c) reife Proteine mit verändertem N-Terminus, welche im wesentlichen dieselbe Aktivität aufweisen;
- 25 (d) ein reifes Protein oder Teile davon, welches aufgrund seiner Abstammung aus anderen Wirbeltieren Abweichung in der Aminosäuresequenz aufweist, jedoch im wesentlichen dieselbe Aktivität beibehält.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform verwendet man als 30 biologisch aktiven MP121

- (a) den reifen Anteil und gegebenenfalls weitere funktionelle Anteile der in SEQ ID NO. 3 oder 4 gezeigten Proteinsequenz
- 35 (b) Teile des reifen Proteins, die im wesentlichen dieselbe Aktivität aufweisen;
- (c) reife Proteine mit verändertem N-Terminus, welche im wesentlichen dieselbe Aktivität aufweisen;

- 6 -

(d) ein reifes Protein oder Teile davon, welches aufgrund seiner Abstammung aus anderen Wirbeltieren Abweichung in der Aminosäuresequenz aufweist, jedoch im wesentlichen dieselbe Aktivität beibehält.

5

Andere Merkmale und Vorteile der Erfindung gehen aus der Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen und den Figuren hervor. Die Sequenzprotokolle und Figuren sind im folgenden kurz beschrieben.

10

SEQ ID NO.1 zeigt die vollständige Aminosäuresequenz des Präproteins des humanen TGF- β -Proteins MP52, die aus der in SEQ ID NO.2 gezeigten Nukleotidsequenz abgeleitet wurde und in WO 95/04819 bereits offenbart ist. Der Beginn des reifen Proteins liegt vorzugsweise im Bereich der Aminosäuren 361-400, besonders bevorzugt bei Aminosäure 382.

SEQ ID NO.2: zeigt die vollständige Nukleotidsequenz der für das TGF- β -Protein MP52 kodierenden DNA, wie sie bereits in WO 20 95/04819 offenbart ist. Das ATG-Startcodon beginnt mit Nukleotid 640. Der Start des vollständigen reifen Proteins beginnt besonders bevorzugt hinter Nukleotid 1782. Das Stopcodon beginnt mit Nukleotid 2143.

25 SEQ ID NO.3 zeigt die vollständige Aminosäuresequenz des Präproteins des humanen TGF- β -Proteins MP121, die bereits in der WO96/01316 offenbart ist. Der Beginn des reifen Proteins liegt vorzugsweise im Bereich der Aminosäuren 217-240, besonders bevorzugt bei Aminosäure 236 oder 237, am meisten bevorzugt bei Aminosäure 237.

SEQ ID NO.4 zeigt die vollständige Aminosäuresequenz des Präproteins des TGF- β -Proteins MP121 aus der Maus, die ebenfalls in der WO96/01316 offenbart ist. Der Beginn des reifen Proteins liegt in Analogie zum humanen Protein im Bereich der Aminosäuren 217 - 240, der Beginn des bevorzugten reifen Proteins bei Aminosäure 236 oder 237.

- 7 -

Figur 1 zeigt ein silbergefärbtes Gel mit im prokaryontischen System exprimiertem, reifem MP52 mit vorangestelltem Methionin sowie reifem MP52 mit einem Histidin-Anhang am N-Terminus vor und nach dem Rückfalten.

5

Figur 2 zeigt ein Chromatogramm zur Trennung von dimeren und monomerem reifen MP52 mit verändertem N-Terminus nach dem Rückfalten.

10 Figur 3 zeigt einen positiven Einfluß auf das Überleben von dopaminergen Neuronen durch Behandlung mit teilgereinigten MP52 aus einem eukaryontem Expressionssystem sowie gereinigtem zurückgefaltetem, reifen MP52 mit verändertem N-Terminus aus einem prokaryontischen Expressionssystem.

15

Figur 4 zeigt, daß der überlebensfördernde Effekt von MP52 auf dopaminerige Neurone zumindest zum Teil auf eine Erhöhung der Anzahl von Astrozyten zurückzuführen ist.

20 Figur 5 zeigt einen Western blot mit Kaninchen-Antikörpern gegen MP121, der mit Hilfe des Vaccina-Viren-Expressionssystems in HepG2-Zellen synthetisiert wurde.

Figur 6 zeigt den stimulierenden Einfluß von gereinigtem MP52
25 und MP121 auf das Auswachsen von Nervenfasern aus der embryonalen Retina.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung umfaßt der reife Anteil des MP52-Proteins Aminosäure 382 bis Aminosäure 501. Bei MP121
30 umfaßt der reife Anteil vorzugsweise Aminosäure 237 bis Aminosäure 352 der SEQ ID NO.3 bzw. der SEQ ID NO.4. Darüber hinaus sind im Rahmen der Erfindung gegebenenfalls aber auch kürzere oder längere funktionelle Teilbereiche des Gesamtproteins eingeschlossen, die im wesentlichen gleiche biologische Aktivität aufweisen, insbesondere Teilbereiche die mindestens den Bereich der sieben konservierten Cysteine umfassen. In der vorliegenden Erfindung konnte unter anderem gezeigt werden,

daß Modifikationen am N-Terminus des reifen Proteins die Aktivität nicht wesentlich beeinflussen.

Umfäßt sind auch MP52- bzw. MP121-Proteine, die aus anderen
s Wirbeltieren isoliert sind, da diese im wesentlichen die gleichen Aktivitäten aufweisen.

Andererseits können Proteine neben dem reifen Anteil von MP52 oder MP121 auch noch funktionelle Signal- oder/und Propeptid-
10 anteile von anderen Proteinen, z.B. von Proteinen mit Cystine Knot Motif (Cell, Vol. 73 (1993) S. 421-424) und insbesondere von anderen Proteinen der TGF- β Superfamilie, z.B. den oben genannten TGF- oder BMP- oder Aktivin/Inhibin-Proteinen, insbesondere auch MP121 bzw. MP52 umfassen. Die entsprechenden
15 Nukleotidsequenzen sind aus den oben genannten Referenzen und der darin zitierten Literatur und/oder der EMBL-Datenbank oder GenBank zu entnehmen, auf deren Offenbarung hiermit Bezug genommen wird. Wichtig ist hierbei, daß der richtige Leserahmen für das reife Protein erhalten bleibt. Je nachdem, in
20 welchen Wirtszellen die Expression stattfindet, könnte das Vorhandensein einer anderen Signalsequenz oder/und eines anderen Propeptidanteils die Expression positiv beeinflussen. Der Austausch von Propeptidanteilen durch entsprechende Anteile anderer Proteine ist z.B. bei Mol. Endocrinol. 5 (1991), S.
25 149-155 und Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993), S. 2905-2909 beschrieben.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ist die Verwendung von Fusionsproteinen, die funktionelle Derivate
30 bzw. Anteile von MP52 bzw. MP121 gemäß der obigen Definition und wie vorzugsweise in SEQ ID NO.1 bzw. 3 oder 4 gezeigt, insbesondere funktionelle Anteile des reifen Proteins aufweisen und darüber hinaus Anteile eines anderen Proteins. Das andere Protein kann hierbei wiederum ein Protein mit "Cystine
35 Knot Motif" sein, das vorzugsweise auch zur TGF- β Superfamilie gehört, wie z.B. auch Kombination von MP 52 mit MP121. Es können jedoch auch Anteile eines komplett anderen Proteins

- 9 -

vorhanden sein, z.B. Rezeptor-bindende Domänen von Proteinen, welche dem ursprünglichen MP52- bzw. MP121-Protein eine andere Spezifität verleihen. Eine wiederum weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ist die Verwendung heterodimerer Proteine aus einem Monomer eines biologisch aktiven MP52 oder MP121 gemäß obiger Definition und einem Monomer eines Proteins aus der Superfamilie von Proteinen mit "Cystine Knot Motif", bevorzugt eines Mitgliedes der TGF- β Superfamilie. Ähnliche heterodimere Proteine sind z.B. in der WO 93/09229, EP 0 626 10 451 A2 und J. Biol. Chem. 265 (1990), S. 13198-13205 beschrieben. Die Merkmale des Proteins können in Abhängigkeit von der Bildung von Homo- oder Heterodimeren variieren und für therapeutische Anwendungen relevant sein.

15 Die in SEQ ID NO.2 gezeigte DNA-Sequenz, Teile davon oder eine Sequenz, die für erfindungsgemäße chimäre Proteine kodiert, können zur Produktion von MP52 verwendet werden. Die Expression kann in eukaryonten und prokaryonten Wirtszellen erfolgen. Geeignete Expressionssysteme sind dem Fachmann bekannt.

20 und es ist leicht feststellbar, welcher minimale Anteil von SEQ ID NO.2 erforderlich ist, um ein exprimiertes Protein zu erhalten, das in den angeführten Versuchen Aktivität zeigt. Zu den Expressionssystemen zählen auch Virensysteme wie z.B. das Baculovirus- oder das Vaccinia-Virus-System. Zur Herstellung

25 einer ausreichenden Menge der gereinigten erfindungsgemäßen Proteine aus der Wirtszelle oder/und dem Zellkulturüberstand zum Einsatz bei der medizinischen Behandlung kann ein Bakterium, wie etwa E.coli oder Bacillus, ein Pilz, wie etwa Hefe, eine Pflanzenzelle, wie etwa Tabak oder Arabidopsis oder eine

30 tierische Wirbeltierzelllinie, wie etwa CHO, HuTK-, NIH-3T3, COS oder Mo-Zelllinien oder eine Insektenzelllinie wie etwa von Spodoptera frugiperda (SF9) oder Trichoplusia ni (TN368) verwendet werden. Unter Ausnutzung rekombinanter Insektenviren wie z.B. Bombyx mori Nuclear Polyhedrosis Virus oder Baculoviren ist eine Expression auch in Insektenlarven wie etwa Bombyx mori oder Spodoptera frugiperda möglich. Ein solches System ist z.B. beschrieben bei Ishida et al. (J. Biochem. 115

- 10 -

(1994), S. 279-285). Bei der Herstellung in Bakterien kann das erfundungsgemäße Protein in Form von Einschlußkörpern (inclusion bodies) vorliegen. Diese Einschlußkörper werden nach an sich bekannten Methoden renaturiert, um das Protein in einer aktiven Form zu erhalten. Es konnte innerhalb der Erfindung gezeigt werden, daß eine Renaturierung zum dimeren MP52 für die Aktivität notwendig ist, da monomeres MP52 keine Aktivität zeigt (siehe Figur 3). Ähnliches gilt für die Herstellung von MP121, die in der WO96/01316 detailliert beschrieben ist.

Zur Herstellung von heterodimeren Proteinen mit anderen Mitgliedern der "Cystine Knot Familie" werden beide Proteinmonomere entweder in derselben Zelle oder getrennt exprimiert, wobei auch eine gemeinsame Renaturierung bei anfallenden Formen von inclusion bodies geeignet erscheint. Bei Coexpression in derselben Zelle sind wiederum insbesondere auch virale Systeme, wie z.B. das Baculoviren-System oder das Vaccinia-Viren System geeignet. Die Herstellung und Reinigung von heterodimeren Proteinen ist prinzipiell dem Fachmann bekannt und z.B. in der WO 93/09229 und der EP 0 626 451 A2 beschrieben. Heterodimere können von Homodimeren z.B. dadurch getrennt werden, daß nacheinander Affinitätssäulen mit Antikörpern spezifisch für jeweils ein Monomer eingesetzt werden.

25

Die Herstellung von chimären Proteinen mit anderen Proteinanteilen erfordert eine entsprechende Veränderung auf DNA-Ebene, die dem Fachmann geläufig ist und von ihm durchgeführt werden kann (EMBO J. 10 (1991), S.2105-2110; Cell 69 (1992) S.329-341; J. Neurosci. 39 (1994), S.195-210).

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform verabreicht man zusätzlich zu biologisch aktivem MP52 oder/und MP121 in einer der oben erwähnten Formen natürlich vorkommende Ganglioside, deren Derivate, Salze oder künstliche Analoga. Des Weiteren ist es bevorzugt, zusätzlich einen Wachstumsfaktor zu verabreichen. Dabei handelt es sich vorzugsweise um ein Protein aus

- 11 -

der Superfamilie der Proteine mit "Cystine Knot Motif", wobei es sich vorzugsweise um ein Protein aus der TGF- β -Superfamilie, der NGF-/Neurotrophin-Familie oder der PDGF-Familie handelt. Besonders bevorzugt sind Wachstumsfaktoren, die zur 5 NGF-/Neurotrophin-Familie zählen wie z.B. die Wachstumsfaktoren NGF, BDNF, NT-3 oder NT4/5. (siehe auch Guidebook to Cytokines and their Receptors, Nicos A., Nicola, A Sambrook and Tooze Publication, Oxford University Press, 1994, Seite 140-143 und die darin zitierte Literatur). Andere bevorzugte 10 Wachstumsfaktoren sind FGF, EGF und Glial Growth Factor. Derartige Kombinationen können zu synergistischen Wirkungen führen, wie es z.B. für Mitglieder der TGF- β -Superfamilie gezeigt ist (Ogawa et al., J. Biol. Chem. 267 (1992), 14233-14237 oder US 5413989).

15

Soweit dies nötig oder vorteilhaft ist, ist es für den Fachmann selbstverständlich, desweiteren in der Pharmazie übliche Träger-, Hilfs-, Verdünnungs- oder Füllstoffe zuzusetzen.

20 Die Verabreichung einer MP52- oder/und MP121-haltigen Zusammensetzung wird zweckmäßigerweise so vorgenommen, daß eine größtmögliche Wirkung erzielt wird, wobei insbesondere ein Einsatz nahe am Zielort von Vorteil sein kann. Die Verabreichung kann u.a. intrazerebral, oral, durch Injektion, durch 25 Inhalation oder als lokale äußerliche Anwendung erfolgen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von biologisch aktivem MP52 oder/und MP121 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung oder/und Prä-30vention von Erkrankungen des Nervensystems oder/und zur Behandlung neuropathologischer Situationen, die durch Alterung des Nervensystems verursacht sind. Bevorzugte Ausführungsformen und Anwendungsmöglichkeiten entsprechen hierbei den Ausführungsformen, die bereits für den vorgenannten Gegenstand 35 der vorliegenden Erfindung detailliert beschrieben wurden.

- 12 -

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Fusionsprotein, das zumindest Teile des reifen Anteils der in SEQ ID NO.1 gezeigten Sequenz von MP52 sowie mindestens Teile eines anderen Proteins aus der Superfamilie der Proteine mit 5 "Cystine Knot Motif" enthält.

Ein derartiges erfindungsgemäßes Fusionsprotein enthält vorzugsweise

- (a) den gesamten reifen Proteinanteil aus SEQ ID NO.1 sowie 10 gegebenenfalls weitere funktionelle Anteile der in SEQ ID NO.1 gezeigten Proteinsequenz;
- (b) den reifen Anteil der in SEQ ID NO.1 gezeigten Proteinsequenz, jedoch mit verändertem N-Terminus, bevorzugt einem vorangestellten Methionin; oder
- 15 (c) den reifen Anteil der in SEQ ID NO.1 gezeigten Proteinsequenz oder Teile davon, welche aufgrund ihrer Herkunft aus anderen Wirbeltieren Abweichungen aufweist, jedoch im wesentlichen die gleiche Aktivität beibehält.

20

Die Herstellung solcher Fusionsproteine ist bereits oben beschrieben ebenso beispielhafte geeignete Proteine, aus denen der nicht MP52-Proteinanteil abgeleitet werden kann.

25 Wiederum ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein heterodimeres Protein, das mindestens einen Teil der in SEQ ID NO.1 gezeigten Sequenz des reifen MP52-Proteins als ein Monomer sowie ein zweites Monomer eines anderen Proteins aus der Superfamilie der Proteine mit "Cystine Knot Motif" 30 enthält. Auch hier ist es wiederum bevorzugt, daß der MP52-Anteil (das MP52-Monomer)

- (a) den gesamten reifen Proteinanteil aus SEQ ID NO.1 sowie gegebenenfalls weitere funktionelle Anteile der in SEQ ID NO.1 gezeigten Proteinsequenz;
- 35 (b) den reifen Anteil der in SEQ ID NO.1 gezeigten Proteinsequenz, jedoch mit verändertem N-Terminus, bevorzugt einem vorangestellten Methionin; oder

- 13 -

(c) den reifen Anteil der in SEQ ID NO.1 gezeigten Proteinsequenz oder Teile davon, welche aufgrund ihrer Herkunft aus anderen Wirbeltieren Abweichungen aufweist, jedoch im wesentlichen die gleiche Aktivität beibehält,
5 enthält.

Die Herstellung von heterodimeren Proteinen sowie Proteine, die sich als Zweitmonomer eignen, sind wiederum bereits oben 10 in der Beschreibung erwähnt.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Arzneimittel zur Behandlung und Prävention von Erkrankungen des Nervensystems oder/und zur Behandlung neuropathologischer 15 Situationen, die durch Alterung des Nervensystems verursacht sind und die eine biologisch wirksame Menge von MP52 oder/und MP121 als Wirkstoff enthalten. Das erfindungsgemäße Arznei- mittel enthält als biologisch aktiver MP52 vorzugsweise

20 (a) den reifen Anteil und gegebenenfalls weitere funktionelle
Anteile der in SEQ ID NO.1 gezeigten Proteinsequenz;
(b) Teile des reifen Proteins, die im wesentlichen dieselbe
Aktivität aufweisen;
(c) reife Proteine mit verändertem N-Terminus, welche im
wesentlichen dieselbe Aktivität aufweisen:

25 (d) ein reifes Protein oder Teile davon, welches aufgrund seiner Abstammung aus anderen Wirbeltieren Abweichung in der Aminosäuresequenz aufweist, jedoch im wesentlichen dieselbe Aktivität beibehält.

30 In einer zweiten bevorzugten Form enthält das erfindungsgemäße
Arzneimittel als biologisch aktiven MP121

(a) den reifen Anteil und gegebenenfalls weitere funktionelle Anteile der in SEQ ID NO.3 oder 4 gezeigten Proteinsequenz;

35 (b) Teile des reifen Proteins, die im wesentlichen dieselbe Aktivität aufweisen;

- 14 -

- (c) reife Proteine mit verändertem N-Terminus, welche im wesentlichen dieselbe Aktivität aufweisen;
- (d) ein reifes Protein oder Teile davon, welches aufgrund seiner Abstammung aus anderen Wirbeltieren Abweichung in der Aminosäuresequenz aufweist, jedoch im wesentlichen dieselbe Aktivität beibehält.

Die Therapiemöglichkeiten des Proteins können abhängig von der Bildung von Homodimeren oder Heterodimeren mit anderen Proteinen mit "Cystine Knot Motif" und insbesondere TGF- β - oder NGF-Proteinen sowie durch Verwendung chimärer Proteine variieren. Solche Strukturen können sich ebenfalls für klinische Anwendungen geeignet erweisen und bilden daher ebenfalls einen Gegenstand der vorliegenden Anmeldung.

Umfaßt sind somit auch pharmazeutische Zusammensetzungen, die erfindungsgemäße heterodimere Proteine und/oder Fusionsproteine enthalten. Von Vorteil kann bei einer pharmazeutischen Zusammensetzung auch die Kombination von MP52 oder MP121 mit anderen Proteinen der TGF- β Superfamilie wie z.B. GDNF, den TGF- β s, den BMPs und den Aktivinen oder mit Proteinen der NGF-/Neurotrophin-Familie wie z.B. dem NGF, den Neurotrophinen wie z.B. NT-3, -4/5 oder BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) oder auch Wachstumsfaktoren wie FGF (Fibroblast Growth Factor), EGF (Epidermal Growth Factor), Glial Growth Factor, PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) sein. Solche Kombinationen sind ebenfalls Gegenstand der Anmeldung.

Gegebenenfalls umfaßt eine erfindungsgemäße Zusammensetzung neben den Wirkstoffen pharmazeutisch akzeptablen Träger-, Hilfs-, Verdünnungs- oder/und Füllstoffe.

Bevorzugt kann eine solche Zusammensetzung auch natürlich vorkommende Ganglioside, deren Derivate, Salze oder künstlichen Analoga umfassen.

- 15 -

Zur Behandlung oder Prävention von Nervenerkrankungen können MP52 oder MP121 injiziert, oral, nicht-oral, intrazerebral, durch Inhalation, als lokale, äußerliche Anwendung oder durch jegliche andere pharmazeutisch übliche Methode verabreicht werden. Die Dosis liegt im Bereich von 0,1 bis 1000 µg/kg Körpergewicht.

Denkbar ist eine Applikation von biologisch aktivem MP52 oder/und MP121 bzw. von erfindungsgemäßen heterodimeren Proteinen und/oder chimären Proteinen z.B. aber auch über implantierte embryonale Stammzellen, die zuvor durch Transfektion geeigneter DNA Elemente zu einer konstitutiven Expression der erfindungsgemäßen Proteine, insbesondere von MP52 oder MP121 gebracht wurden. Weiterhin möglich ist eine Bereitstellung der erfindungsgemäßen Proteine, insbesondere von biologisch aktivem MP52 oder MP121, durch bestimmte virale Systeme. Somit ist es möglich, geeignete Vektoren mit der erfindungsgemäßen DNA Sequenz in vitro oder in vivo in Patientenzellen zu transfizieren oder die Vektoren in vitro in Zellen zu transfizieren und diese dann einem Patienten zu implantieren.

Weiterhin ist die Anwendung dieser pharmazeutischen Zusammensetzung nicht auf Menschen beschränkt, sondern kann auch Tiere, insbesondere Haustiere umfassen.

25

Generell können mit den erfindungsgemäß verwendeten Proteinen Krankheiten des Nervensystems behandelt werden, die in irgend-einer Form mit der Expression von MP52 bzw. MP121 zusammen-hängen oder auf MP52 oder MP121 auf irgendeine Weise anspre-chen, einerseits durch die Erhöhung der Menge bzw. der Aktivi-tät an vorhandenem MP52 oder MP121, auf der anderen Seite auch durch Unterdrückung der MP52- bzw. MP121-Aktivität. Eine Unterdrückung der MP52- bzw. MP121-Aktivität kann durch Hemmung der Transkription und/oder der Translation z.B. durch dem 30 Fachmann bekannte Antisense-Nukleinsäuren erfolgen. Eine an-dere Möglichkeit ist die Bindung von Molekülen an MP52- oder MP121-Rezeptoren, die im Gegensatz zu MP52 bzw. MP121 keine

- 16 -

Signalweiterleitung auslösen. Es sind daher im Rahmen der Erfindung auch die Rezeptoren für MP52 oder MP121 an Zellen von Interesse. Zum Auffinden von Rezeptoren können zunächst verschiedene Zelllinien auf ihr Bindungsverhalten von radioaktiv markiertem MP52 bzw. MP121 (^{125}I -MP52 oder ^{125}I -MP121) mit anschließenden cross-linking getestet werden. Von Zellen, die MP52 bzw. MP121 binden, kann nachfolgend eine cDNA Bibliothek in einem Expressionsvektor (z.B. erhältlich bei InVitrogen) angelegt werden. Zellen die mit Rezeptor cDNA transfiziert wurden, können dann über die Bindung von radioaktiv markiertem MP52 bzw. MP121 selektiert werden. Dies sind dem Fachmann bekannte Methoden, wie sie z.B. für die Isolierung von Aktivin- (Mathews, L.S. & Vale, W.W. Cell 65 (1991) S.973-982) und TGF- β -Rezeptoren Typ II (Lin et al. Cell 68 (1992) S.775-785) verwendet wurden. Es ist in Analogie zu den bekannten Aktivin-, TGF- β - und BMP- Rezeptoren zu vermuten, daß es sich bei den Rezeptor für MP52 und MP121 ebenfalls um einen in diese Familie gehörenden Rezeptorkomplex handelt, so daß zum Auffinden von Teilen des heteromeren Komplexes weitere dem Fachmann bekannte Methoden wie z.B. PCR mit degenerierten Oligonukleotiden verwendet werden können. Diese Methode ist z.B. auch bei dem Aktivin-Rezeptor Typ I, TGF- β -Rezeptoren Typ I und BMP-Rezeptoren Typ I angewendet worden (Tsuchida et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 11242-11246; Attisano et al. (1993) Cell 75, 671-680; Franzén et al. (1993) Cell 75, 681-692; ten Dijke et al. (1994) J. Biol. Chem. 269, 16985-16988; Koenig et al. (1994) Mol. Cell. Biol. 14, 5961-5974).

Die Erfindung soll durch die folgenden Beispiele veranschaulicht werden.

Beispiel 1:

Eukaryontische Expression und Reinigung von MP52

Für die Expression von MP52 wurden Vaccinia Viren gewählt, deren Verwendung ausführlich und für den Fachmann nacharbeitbar in den Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et

- 17 -

al., Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, Wiley & Sons (1989-1995)) im folgenden abgekürzt mit CP unter Chapter 16 Unit 16.15-16.18 beschrieben ist. Die cDNA mit dem gesamten kodierenden Bereich für MP52 wurde in den Vektor pBP1 s kloniert. Das resultierende Plasmid (pBP1MP52s) wurde bei der DSM (Hinterlegungsnummer 9217) am 24. Mai 1994 hinterlegt und für die Herstellung von rekombinanten Vaccinia Viren wie in WO 95/04819 offenbart eingesetzt. Die Expression von MP52 in 143B Zellen (HuTk-, ATCC CRL 8303) nach Infektion mit rekombinanten 10 Vaccinia Viren erfolgte wie offenbart in WO 95/04819. Die Teilreinigung von MP52 erfolgte, wie in derselben Offenbarung beschrieben, über eine Heparin Säule (HiTrap™, Pharmacia #17-0407-01) und einer anschließenden Reversed Phase HPLC (C8-Säule, Aquapore RP300, Applied Biosystems, Partikelgröße: 15 7 µm, Porengröße: 300 Å). Die Fraktionen mit MP52 wurden gepoolt, lyophilisiert und bei -80°C aufbewahrt.

Beispiel 2:

Prokaryontische Expression, Reinigung und Rückfaltung zum 20 aktiven MP52

Die mögliche Expression von MP52 in E.coli ist bereits in WO 93/16099 und WO 95/04819 offenbart, die Expression von reifem MP52 auch mit angehängten Histidinen am N-Terminus ist ebenfalls offenbart (WO 95/04819). Die zusätzlichen Histidine erleichtern die Aufreinigung des Proteins durch Bindung an Metallchelat-Säulen. Nach Aufreinigung kann das in E.coli als Monomer exprimierte reife MP52 Protein dann zu einem Dimer zurückgefalten werden. Der größte Teil des reifen Anteils von 25 MP52 (Aminosäure 383 bis 501 in SEQ ID NO.2) mit 10 zusätzlichen Aminosäuren einschließlich 6 Histidinen am N-Terminus (MHHHHHHHKLI) wurde in dem prokaryontischen Vektor pBP2 exprimiert. Dieser Vektor ist ein pBR322 Derivat mit Ampicillinresistenz, der zusätzlich den T7 Promoter aus dem pBluescript II 30 SK Plasmid (Stratagene) enthält. Weiterhin enthält der Vektor nach dem T7-Promoter eine ribosomale Bindestelle und ein 35 Startcodon als Teil einer Nde I Restriktionsschnittstelle ge-

folgt von 6 Codons für Histidin. Hinter mehreren Restriktions-schnittstellen (Hind III, Eco RI, Xho I, Bam HI, Sma I und Apa I) für die Insertion von Inserts sowie Stopcodons in allen drei Leserahmen folgt ein Terminator (T_ø). Das Plasmid 5 pBP2MP52His wurde am 2. Juni 1995 bei der DSM (Hinterlegungsnummer: DSM 10028) hinterlegt. Derselbe Vektor wurde unter Ausnutzung der Nde I Restriktionsschnittstelle zur Expression des reifen MP52 (Aminosäure 382 bis 501 in SEQ ID NO.1) mit nur einem zusätzlichen Methionin am N-Terminus verwendet. Das 10 Plasmid pBP2MP52m wurde am 2. Juni 1995 bei der DSM (Hinterlegungsnummer: DSM 10029) hinterlegt. Die Expression von MP52 Protein mit (MP52His) oder ohne (MP52m) Histidin Anhang kann durch gleichzeitige Bereitstellung von T7-RNA Polymerase erfolgen. Die T7-RNA Polymerase kann über verschiedene Methoden 15 bereitgestellt werden, wie z.B. ein zweites Plasmid mit einem Gen für T7 RNA Polymerase oder durch Infektion mit Phagen, die für die T7 RNA Polymerase kodieren oder aber durch spezielle Bakterienstämme, die das Gen für T7 RNA Polymerase integriert haben. Unter Verwendung des Bakterienstammes BL21(DE3)pLysS 20 (Novagen, #69451-1) und Induktion der T7 RNA Polymerase nach Herstellerangaben mit IPTG, wird das MP52 Protein mit und ohne His-Tag in Einschlußkörpern gebildet aus denen die Proteine nach Standardmethoden isoliert werden können. Aufgrund des His-Tag kann MP52His Protein über metallchelatbildende Säulen 25 wie z.B. beschrieben in Hochuli et al. (BIO/Technology Vol. 6, 1321-1325 (1988)) gereinigt werden. MP52His und MP52m wurden weiter über eine Reversed Phase HPLC gereinigt. Es wurde eine Reversed Phase Säule (Nucleosil 300-7C4 von Macherey-Nagel, Art. 715023) mit einer Flußrate von 2 ml/min und einem Aceto- 30 nitrilgradienten in 0.1 % TFA von 0 bis 90% in 100 min verwendet. Unter diesen Bedingungen beginnt die Elution von monomerem MP52His und MP52m bei ca. 35% Acetonitril. Der Nachweis, daß es sich um MP52 Protein handelt, wurde jeweils über Western blot Analyse mit MP52 spezifischen Antikörpern ge- 35 führt. MP52m (121 Aminosäuren) bzw. MP52His (129 Aminosäuren) zeigen in SDS-Polyacrylamid-Gelen (15%) ein apparentes Molekulargewicht von ca. 14 kD (theoretisches Molekulargewicht: 13.7

- 19 -

kD) bzw. 15 kD (theoretisches Molekulargewicht: 14.8 kD) wie es nach Silberfärbung in Figur 1 gezeigt ist.

Um biologisch aktives Material zu erhalten, kann das in E.coli exprimierte und aufgereinigte monomere MP52 zu einem dimeren MP52 zurückgefaltet werden. Dies kann nach dem Fachmann bekannten Methoden, wie z.B. beschrieben von Jaenicke, R. & Rudolph, R. (Protein structure, ed. Creighton, T.E., IRL Press, chapter 9 (1989)), erfolgen. Da für jedes Protein die Bedingungen zum Rückfalten im einzelnen variieren, wurden die Bedingungen für die Proteine MP52His und MP52m in Hinblick auf die Solubilisierung sowie pH-Werte, Temperatur und Redoxsysteme während der Renaturierung getestet. Für die Solubilisierung der gereinigten und lyophilisierten MP52 Proteine zeigten sich typische Reagenzien wie Harnstoff und Guanidiniumchlorid als geeignet. Vorzugsweise erfolgte die Solubilisierung über 2 Stunden bei Raumtemperatur in Solubilisierungspuffer (6 M Guanidiniumchlorid, 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 3 mM DTT pH 8.0) auf eine Endkonzentration von 2.6 mg MP52His oder 20 MP52m pro ml. Das Solubilisat wurde dann zu Renaturierungspuffer vorzugsweise in einer Endkonzentration von 150 - 200 µg MP52His oder MP52m pro ml gegeben.

Für die Renaturierung zeigte sich, daß die Verwendung hoher pH Bereiche (pH 8 - 10) sich günstig auf das Zurückfalten zu aktiven MP52-Dimer Proteinen auswirkte. Dabei können gängige Puffersysteme wie Phosphat- oder Tris-Puffer mit 1-2 M NaCl und weiteren Zusätzen wie z.B. EDTA (2-10 mM) und Chaps (15 - 50 mM) verwendet werden. Es können in der Literatur beschriebene (z.B. Jaenicke, R. & Rudolph, R., Protein structure, ed. Creighton, T.E., IRL Press, chapter 9 (1989)), gängige Redoxsysteme wie z.B. oxidiertes und reduziertes Glutathion (z.B.: 1 mM GSSG, 2 mM GSH) eingesetzt werden. Das Zurückfalten kann effektiv im Bereich von 4°C bis Raumtemperatur über z.B. 48 Stunden durchgeführt werden. MP52 Proteine lassen sich unter solchen Bedingungen zu 50-90 % in die dimere Form überführen. Die genannten Bedingungen sind als beispielhaft zu betrachten

- 20 -

und sind nicht limitierend. Es ist dem Fachmann möglich, durch Variation einzelner Bedingungen, MP52 mit ähnlichen Effizienzen in ein dimeres aktives Protein zu überführen. Die Analyse der rückgefalteten Proteine erfolgte über Reversed Phase HPLC sowie in silbergefärbten Gelen. Für die HPLC wurden die MP52 Proteine an eine Säule (Aquapore RP-300, 7 µm, Applied Bio-systems) bei 35 % Puffer B (Puffer A: 0,1 % TFA in Wasser; Puffer B: 90 % Acetonitril, 0,1 % TFA) mit einer Flußrate von 0,2 ml/min gebunden. In einem Acetonitrilgradienten von 35 bis 10 60 % Puffer B über 50 min lassen sich die monomeren und dimeren MP52 Proteine voneinander trennen (siehe Figur 2). Der Anteil von rückgefaltetem MP52Hис bzw. MP52m wird auf ca. 70-90 % geschätzt. In 15 % Polyacrylamid Gelen läuft das dimeres MP52m bei ungefähr 22 kD (theoretisches Molekulargewicht: 15 27,4 kD) und MP52Hис bei ungefähr 24 kD (theoretisches Molekulargewicht: 29,6 kD) abgeschätzt nach einem Molekulargewichtsmarker (siehe Figur 1). Der Histidin Anhang zeigt dabei keine signifikante Beeinflussung der Rückfaltungseffizienz. Testet man die Aktivität beider Proteine über die Bestimmung der 20 alkalischen Phosphatase (ALP) Aktivität auf ROB-C26 Zellen, wie es z.B. in WO 95/04819 offenbart ist, so zeigt sich, daß MP52Hис trotz des veränderten N-Terminus aktiv ist, die Aktivität gegenüber MP52m aber leicht reduziert ist.

25 Beispiel 3:

Einfluß von MP52 auf dopaminerige Neurone

Zur Überprüfung des Einflusses von MP52 auf dopaminerige Neurone wurden Neurone vom Mittelhirnboden von 14 Tage alten 30 Rattenembryonen (E14) nach einer Methode beschrieben bei Shimoda et al. (Brain Res. 586, 319-331 (1992)) isoliert. Die Vereinzelung und Kultivierung der Zellen erfolgte wie beschrieben bei Krieglstein et al. (Neuroscience 63, 1189-1196 (1994)). Die Zelldichte beträgt 200.000 Zellen/cm² auf Poly- 35 ornithin/Laminin beschichteten Deckgläsern. Nach 24 Stunden Kultivierung und anschließend alle drei Tage wurden zwei Drittel des Mediums (500 µl) entfernt und ersetzt durch frisches

Medium mit den entsprechenden Zusätzen. Das nach der Heparin-Sepharose und Reversed Phase HPLC lyophilisierte teilgereinigte MP52 wurde in 50% Acetonitril gelöst und dem Medium zugesetzt. Gleiches erfolgte mit zurückgefaltetem und gereinigtem MP52His. Die Endkonzentration von MP52 bzw. MP52His im Medium beträgt 20 ng/ml (Endkonzentration von Acetonitril ist 0.3 %). Als Kontrolle wurde eine vergleichbare Menge von gereinigtem monomerem MP52His in 50% Acetonitril gelöst und eingesetzt. Die Mediumkontrolle enthält ebenfalls 0.3 % Acetonitril. Nach acht Tagen wurden die Kulturen in 4% Paraformaldehyd für 10 min bei Raumtemperatur fixiert, die Zellen mit Aceton (10 min, -20°C) permeabilisiert und mit PBS (Phosphate buffered saline) gewaschen. Nach Behandlung mit 1% H₂O₂ in PBS, waschen und Blocken mit Pferdeserum erfolgte eine immuncytochemische Färbung. Die Tyrosinhydroxylase (TH) ist ein limitierendes Enzym bei der Biosynthese von Dopamin und anderen Katecholaminen, so daß TH in den vorliegenden Kulturen (Noradrenalin enthaltende Zellen werden nicht isoliert) als Marker für dopaminerige Neurone verwendet werden kann. TH wurde nachgewiesen über eine einstündige Inkubation bei 37°C mit einem Maus monoklonalen Antikörper gegen Ratten TH (1:200 verdünnt, Boehringer Mannheim) und nachfolgender Detektion mit dem Vectastain ABC kit (Vecto Labs). Die TH-positiven Zellen wurden in einer Fläche von 0.12 cm² ausgezählt. Für die immuncytochemische Färbung von GFAP (glial fibrillary acidic protein) wurden die fixierten Zellen mit Aceton (20 min, 20°C) permeabilisiert und mit PBS (Phosphate buffered saline) gewaschen. Nach Inkubation mit einem 1:200 verdünnten Maus monoklonalen Antikörper gegen GFAP (Sigma) folgte eine Inkubation mit einem Peroxidase gekoppelten Antikörper gegen den monoklonalen Maus Antikörper. Die Visualisierung erfolgte nach Standardmethoden durch Zugabe des Enzym Substrates DAB (Diaminobenzidin).

- 22 -

Beispiel 4:

Untersuchung zur Transkription von MP52 in Gehirn und Rückenmark

5 Zur Feststellung, ob MP52 in Gehirn und/oder Rückenmark transkribiert wird, wurde die total RNA aus Rückenmark von Ratten und Gesamtgehirn bzw. einzelnen Regionen des Gehirns aus Mäusen nach Standardmethoden isoliert und nach dem Fachmann bekannten Methoden in cDNA umgeschrieben. Die cDNA, die aus 10 jeweils 100 ng RNA gewonnen wurde, wurde in eine PCR (Polymerase Chain Reaction) eingesetzt. Die für die Amplifikation eingesetzten Primer (CAACAGCAGCGTGAAGTTGGAG und ACTAATGTCAAACACGTACCTCTG) befinden sich bei humaner genomicscher DNA auf unterschiedlichen Exonen, so daß genomische DNA 15 von cDNA unterschieden werden kann. Als Kontrolle wurden 0,5 µg genomische Maus DNA eingesetzt, die ebenfalls kein PCR Fragment wie cDNA ergibt. Die PCR wurde über 30 Cyclen (94°C, 54°C, 72°C) in je 50 µl Reaktionsansatz (je 200 µM NTPs, 30 pmol jeden Primers, 16.6 mM (NH₄)₂SO₄, 67 mM Tris/HCL pH 8.8, 20 2 mM MgCl₂, 6,7 µM EDTA, 10 mM β-Mercaptoethanol, 170 µg/ml BSA, 5 U AmpliTaq (Perkin Elmer #N8080160) durchgeführt. Ein Drittel der PCR Produkte wurden im 4% Agarose Gel aufgetrennt, im Southern blot auf Membranen transferiert und durch Hybridisierung mit einer MP52 Probe die Spezifität der PCR Fragmente nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, daß MP52 sowohl 25 im Rückenmark als auch in einzelnen Gehirnregionen transkribiert ist.

Beispiel 5:

30 Eukaryontische Expression und Reinigung von MP121

Für die Expression von MP121 wurden wie für MP52 in Beispiel 1 Vaccinia-Viren gewählt. Die cDNA mit dem gesamten codierenden Bereich für MP121 wurde in den Vektor pBP1 kloniert (das 35 resultierende Plasmid pBP1MP121 wurde am 12.01.95 bei der DSM unter der Nummer 9665 hinterlegt) und zur Herstellung von rekombinanten Vaccinia-Viren eingesetzt. Bei Infektion von

- 23 -

Zellen, wie z.B. NIH-3T3 Zellen (DSM ACC 59, swiss mouse embryo), mit den rekombinanten Viren, kommt es zur Expression von MP121. Die einzelnen Schritte sind detailliert in der WO96/01316 offenbart. Im Zuge der Expressionsversuche wurden 5 auch andere Zelllinien getestet. Dabei stellt sich überraschenderweise heraus, daß bei einigen Zelllinien neben dem dimeren MP121 auch deutliche Mengen eines monomeren MP121 gebildet werden. Da dieses Monomer bei der Analyse im Polyacrylamidgel (mit anschließender Detektion durch Westernblot-Analyse) 10 schneller läuft als das durch Reduktion des Dimers erhaltene Monomer, muß es sich um ein gefaltetes monomeres MP121, das eine globulärere Struktur aufweist, handeln. Als Beispiel ist in Figur 5 die Expression von MP121 in HepG2-Zellen (Hepatozelluläres Karzinom, Mensch, ATCC HB8065) gezeigt. Da mittlerweile durch Northern blot-Analyse gezeigt werden konnte, 15 daß MP121 in HepG2 (Hepatozytenzelllinie aus der Leber) natürlich exprimiert wird, ist davon auszugehen, daß auch der monomeren Form von MP121 eine physiologische Bedeutung zukommen kann. Das monomere MP121 tritt neben dem dimeren MP121 in 20 signifikanten Mengen, z.B. auch auf in Mv1Lu (NBL-7, Lunge, Nerz, ATCC CCL 64) oder Hela (Epitheliales Karzinom, Gebärmutterhals Mensch, ATCC CCL 2).

Bei Expressionsversuchen von MP121 unter Ausnutzung des 25 Baculoviren-Systems in Insektenlarven (*Trichoplusia ni*) wurde die dimere Form in der Haemolyphe gefunden.

Die Teilreinigung von MP121 aus Zellkulturüberstand erfolgte wie in der WO96/01316 beschrieben über Phenyl-Sepharose und 30 Reversed Phase HPLC. Parallel wurde nach derselben Methodik die entsprechende Menge Zellkulturüberstand nach Infektion mit Wildtyp Viren (wt) als Kontrolle aufgearbeitet. Es konnte bei Versuchen zur Verbesserung der Reinigung gezeigt werden, daß 35 die alternierende Verwendung von Laufmitteln, die TFA (Trifluoressigsäure) oder HFBA (Heptafluorbuttersäure) enthalten kombiniert mit geänderten Gradientenverläufen, der Reinheitsgrad von MP121 wesentlich erhöht werden konnte. Dazu wird z.B.

- 24 -

zunächst eine Säule (Aquapore RP-300, Applied Biosystems, Partikelgröße: 7 μm) bei einer Flußgeschwindigkeit von 0,2 ml/min mit 0,1 % TFA (1,36 % Acetonitril pro min), dann eine Säule mit 0,2 % HFBA (0,23 % Acetonitril pro min) und zum 5 Schluß eine Säule noch mal mit 0,1 % TFA (0,23 % Acetonitril pro min) im Laufmittel eluiert. Die eluierten Fraktionen die MP121 enthalten können nach jedem Lauf vereinigt, lyophilisiert und dann für den Auftrag auf die neue Säule in 0,1 % TFA/H₂O resuspendiert werden. Zum Schluß wurden die lyophilisierten Proben bis zum Gebrauch bei -70°C gelagert. Die Men- 10 genabschätzung erfolgte in Western blot-Analysen im Vergleich mit MP121m (Aminosäure 237 bis 352 in SEQ. ID. NO. 2 mit einem zusätzlichen Methionin am N-Terminus), das ähnlich wie MP52, 15 in E.coli, allerdings unter Verwendung des Stammes HMS 174 (DE3) (Novagen #69453) hergestellt wurde. Die Reinigung erfolgte nach Standardmethoden aus Einschlußkörpern mit anschließendem Waschen der Einschlußkörper mit 2 M Guanidiniumchlorid/HCl in 20 mM Tris pH 8.0 (unter Ultraschall) und Re- 20 suspension in 6M Guanidiniumchlorid/HCl in 20 mM Tris pH 8.0 mit anschließender Reinigung über die Reversed Phase nach Standardmethoden.

Beispiel 6:

Einfluß von MP52 und MP121 auf Neurone der Retina

Um den Einfluß von MP52 und MP121 in einem anderen System zu untersuchen, wurden Gewebekulturen von Retina aus Hühnerembryonen isoliert. Die Methode zur Isolation von ungefähr gleich großen scheibchenförmigen Gewebestückchen aus der Retina ist im Detail beschrieben bei Carri, N.G. und Ebendal, T. (Dev. Brain Res., Vol. 6 (1983), 219-229), Carri, N.G. und Ebendal, T. (Anat. Rec., Vol. 214 (1986), S. 226-229) und Carri, N.G. et al. (J. Neurosci. Res. Vol. 19 (1988), S. 428-439). 30

35

In diesem Versuchen mißt man in vitro die Stimulation des Auswachsens von Nervenfasern aus embryonalen Retina Explanta-

- 25 -

ten auf einer Kollagen-Matrix. Kurz beschrieben werden die Gewebeteile mit einer Glaskapillare aus der Retina von Hühnerembryonen (Weißes Leghorn, 6. Tag der Embryonalentwicklung) entnommen und durch wiederholtes Waschen das Pigmentepithel 5 der Retina und mesenchymale Zellen entfernt. Die so behandelten Gewebeteilchen wurden auf Kollagen beschichteten Kulturschalen überführt und über Nacht inkubiert (37,5°C, 5 % CO₂). Anschließend werden die entsprechenden Faktoren oder Kontrollen zugesetzt und die Kulturen weiter inkubiert. Für MP52 10 wurde das dimere MP52m, so wie es in Beispiel 2 beschrieben ist, in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Das monomere MP52, das bislang in keinem Versuch Aktivität gezeigt hat, wurde als negative Kontrolle in den entsprechenden Konzentrationen eingesetzt. Für MP121 wurde das in Beispiel 5 beschrie- 15 bene teilgereinigte Material nach Phenyl-Sepharose und Reversed Phase HPLC in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Das nach Wildtyp-Infektion entsprechend gewonnene Material wurde als Kontrolle eingesetzt. Als unabhängige Kontrolle wurden die Explantate in Kulturmedium mit etwas Rinderserum- 20 albumin gehalten.

Die Proteine wurden in einem wäßrigen Puffer oder 50 % Acetonitril gelöst und im Kulturmedium auf Endkonzentrationen von 1,25 ng/ml, 12,5 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 25 ng/ml weiterverdünnt. Die Art des Lösens hatte keinen Einfluß auf das Ergebnis.

Nach vier Tagen in Kultur wurde die maximale Länge der führenden Nervenbündel unter dem Mikroskop im Dunkelfeld gemessen. 30 Wie in Tabelle 1 und 2 gezeigt, stimulieren sowohl MP52 als auch MP121 dosisabhängig das Auswachsen der Neurite. MP52 hat die maximale Aktivität im Bereich von 25 - 100 ng/ml und MP121 zeigt maximale Aktivität im Bereich von ca. 25 ng/ml, was einer tatsächlichen Faserlänge von 1,3 - 1,7 mm bzw. 1,7 mm 35 gegenüber 0,2 mm für die Negativ-Kontrolle entspricht. Monomeres MP52 und die Wildtyp-Kontrolle zeigten keine Stimulation, die über die Negativ-Kontrolle hinaus ging.

Tabelle 1

	dimeres MP52m (ng/ml)	Länge (Einheiten)	Mittelwert ± SEM
	1,25	15/9/4/13	10,2 ± 2,4
5	12,5	25/18/10/21	18,5 ± 3,1
	25	74/38/48/47/27/30	44,0 ± 6,9
	50	62/65/52/51/50/62	57,0 ± 2,4
	100	26/33/61/70/57/61	51,5 ± 7,3
	200	10/13/11/9	10,7 ± 0,8

10

Tabelle 1: Länge der retinalen Neurite nach 4 Tagen Kultur unter Einwirkung verschiedener Konzentrationen von MP52. Die Neuritlängen der Kontrollen, die nur Kulturmedium enthielten, betrugen 5,5/8/10/11/4,8/7 Einheiten mit einem Mittelwert von 7,7 Einheiten (SEM 1,0). Die Neuritlängen der Kontrollen mit monomeren MP52m (gleiche Konzentrationen wie für dimeres MP52m) ergaben im Mittel gleiche Längen wie die Kontrolle, die nur Kulturmedium enthielt. Eine Einheit entspricht einem tatsächlichen Maßstab von 0,03 mm in der Kulturschale.

Tabelle 2

	MP121 (ng/ml)	Länge (Einheiten)	Mittelwert ± SEM
25	1,25	7/12/5/6	7,5 ± 1,5
	12,5	19/20/13/26	19,5 ± 2,6
	25	50/52/60/71/65/53	58,5 ± 3,4
	50	37/32/48/41/36/20	35,6 ± 3,8
30	100	21/8/19/18	16,5 ± 2,9
	200	11/8/12/10	10,2 ± 0,8

Tabelle 2: Länge der retinalen Neurite nach 4 Tagen Kultur unter Einwirkung verschiedener Konzentrationen von MP121. Die Neuritlängen der Kontrolle mit parallel gereinigtem Zellkulturüberstand aus der Wildtyp-Infektion ergaben im Mittel gleiche

35

- 27 -

Längen wie die Kontrolle, die nur Kulturmedium enthielt (siehe Text zu Tabelle 1).

Eine Einheit entspricht einem tatsächlichen Maßstab von 0,03 mm in der Kulturschale.

5

Detaillierte Beschreibung der Figuren:

10

15

20

25

30

35

Figur 1: Silbergefärbtes 15%iges Polyacrylamidgel mit je 0,2 µg MP52His (Spur 2 und 4) oder 0,2 µg MP52m (Spur 3 und 5) nach Aufreinigung der monomeren Form (Spur 2 und 3) bzw. nach dem Zurückfalten zum dimeren aktiven Protein und Abtrennung restlicher Monomere über die HPLC (Spur 4 und 5). Der Molekulargewichtsmarker (15 kD, 25 kD, 35 kD, 50 kD, 75 kD, 100 kD, 150 kD) in Spur 1 ist von Novagen (#69149-1).

Figur 2: Das Chromatogramm zeigt das Laufverhalten von so-lubilisiertem monomerem MP52His (•••) sowie die Trennung von dimerem MP52His von restlichen monomeren Formen nach dem Renaturieren (—) auf einer Reversed Phase HPLC. Dimeres MP52His eluiert unter den gewählten Bedingungen früher als die monomere Form. Der Acetonitrilgradient bezogen auf % Puffer B ist ebenfalls eingezeichnet.

Figur 3: Anzahl der überlebenden TH-immunreaktiven dopaminerigen Neurone nach Isolation aus dem Mittelhirn von Rattenembryonen (E14) und 8 Tagen Kultivierung. Neben der Kontrolle mit unbehandelten Neuronen (Medium mit 0.3 % Acetonitril) ist der Effekt bei Zusatz von 20 ng/ml gereinigtem monomerem MP52His aus der Expression in E.coli (MP52His Monomer), 20 ng/ml gereinigtem MP52His aus der Expression in E.coli nach der Renaturierung zum dimeren Protein (MP52His Dimer), sowie 20 ng/ml bzw. 2 ng/ml teil-gereinigtem MP52 aus der Expression in Vaccinia

- 28 -

Viren (MP52) abgebildet. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SEM aus einer Dreifachbestimmung.

Figur 4: Fotografie von Zellen nach Isolation aus dem Mit-
telhirn von Rattenembryonen (E14) nach 8 Tagen Kul-
tur und Anfärben von GFAPs (glial fibrillary acidic
proteins). Gezeigt ist der Effekt von 20 ng/ml ge-
reinigtem monomerem MP52His (A) aus der Expression
in E.coli, 20 ng/ml gereinigtem dimerem MP52His (B)
aus der Expression in E.coli nach der Renaturie-
rung, unbehandelte Zellen (C, Medium mit 0,3 % Ace-
tonitril als Kontrolle), 20 ng/ml (D) bzw. 2 ng/ml
(E) teilgereinigtes MP52 aus der Expression in Vac-
cinia Viren und 2 ng/ml TGF- β 3 (F).
Fotografiert wurde jeweils ein repräsentativer Aus-
schnitt bei 400-facher Vergrößerung im Mikroskop
(Axiophot) mit Interferenzkontrast. Die Länge des
Balken (—) entspricht 25 μ m.

Figur 5: Western blot mit Kaninchen Antikörpern gegen MP121
1: Zellkulturüberstand von Hep-G2 Zellen nach In-
fektion mit rekombinanten Vaccinia Viren (mit in-
serierter MP121 cDNA) unter nicht reduzierenden
Bedingungen
2: Zellkulturüberstand von Hep-G2 Zellen nach In-
fektion mit Wildtyp Vaccinia Viren unter nicht re-
duzierenden Bedingungen
3: vorgefärbter Protein-Molekulargewichtsmarker
(schematisch eingezeichnet) mit den apparenten Mo-
lekulargewichten von 15,5/18,2/27,8/43,8/71,5 kD
(Gibco BRL #26041-020)
4: Zellkulturüberstand von Hep-G2 Zellen nach In-
fektion mit rekombinanten Vaccinia Viren (mit in-
serierter MP121 cDNA) unter reduzierenden Bedingun-
gen

- 29 -

5: Zellkulturüberstand von Hep-G2 Zellen nach Infektion mit Wildtyp Vaccinia Viren unter reduzierenden Bedingungen

s Figur 6: Auswachsen der Nervenfasern aus embryonaler Hühner Retina nach 4 Tagen in Gewebekultur. Mikroskopische Aufnahme von lebenden Kulturen im Dunkelfeld.

10 A: monomeres MP52m (5 ng/ml) gereinigt aus Einschlußkörpern von E.coli.

B: dimeres MP52m (5 ng/ml) gereinigt aus Einschlußkörpern von E.coli und zum nativen dimeren Protein zurückgefalten.

15 C: MP121 (5 ng/ml) gereinigt aus Zellkulturüberstand nach Expression mit Hilfe des Vaccinia-Systems auf NIH3T3-Zellen.

- 30 -

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER:

(A) NAME: Biopharm Gesellschaft zur biotechnologischen Entwicklung von Pharmaka mbH
 (B) STRASSE: Czernyring 22
 (C) ORT: Heidelberg
 (E) LAND: DE
 (F) POSTLEITZAHL: 69115

(ii) ANMELDETITEL: Verwendung von MP52 oder/und MP121 zur Behandlung und Prävention von Erkrankungen des Nervensystems

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 4

(iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

(A) DATENTRÄGER: Floppy disk
 (B) COMPUTER: IBM PC compatible
 (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
 (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 501 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Met	Arg	Leu	Pro	Lys	Leu	Leu	Thr	Phe	Leu	Leu	Trp	Tyr	Leu	Ala	Trp
1															15
5															10
Leu	Asp	Leu	Glu	Phe	Ile	Cys	Thr	Val	Leu	Gly	Ala	Pro	Asp	Leu	Gly
															30
20															25
Gln	Arg	Pro	Gln	Gly	Thr	Arg	Pro	Gly	Leu	Ala	Lys	Ala	Glu	Ala	Lys
															45
35															40
Glu	Arg	Pro	Pro	Leu	Ala	Arg	Asn	Val	Phe	Arg	Pro	Gly	Gly	His	Ser
															60
50															55
Tyr	Gly	Gly	Gly	Ala	Thr	Asn	Ala	Asn	Ala	Arg	Ala	Lys	Gly	Gly	Thr
															80
65															70
Gly	Gln	Thr	Gly	Gly	Leu	Thr	Gln	Pro	Lys	Lys	Asp	Glu	Pro	Lys	Lys
															95
85															90
Leu	Pro	Pro	Arg	Pro	Gly	Gly	Pro	Glu	Pro	Lys	Pro	Gly	His	Pro	Pro
															110
100															105
Gln	Thr	Arg	Gln	Ala	Thr	Ala	Arg	Thr	Val	Thr	Pro	Lys	Gly	Gln	Leu
															125
115															120

- 31 -

Pro Gly Gly Lys Ala Pro Pro Lys Ala Gly Ser Val Pro Ser Ser Phe
 130 135 140
 Leu Leu Lys Lys Ala Arg Glu Pro Gly Pro Pro Arg Glu Pro Lys Glu
 145 150 155 160
 Pro Phe Arg Pro Pro Pro Ile Thr Pro His Glu Tyr Met Leu Ser Leu
 165 170 175
 Tyr Arg Thr Leu Ser Asp Ala Asp Arg Lys Gly Gly Asn Ser Ser Val
 180 185 190
 Lys Leu Glu Ala Gly Leu Ala Asn Thr Ile Thr Ser Phe Ile Asp Lys
 195 200 205
 Gly Gln Asp Asp Arg Gly Pro Val Val Arg Lys Gln Arg Tyr Val Phe
 210 215 220
 Asp Ile Ser Ala Leu Glu Lys Asp Gly Leu Leu Gly Ala Glu Leu Arg
 225 230 235 240
 Ile Leu Arg Lys Lys Pro Ser Asp Thr Ala Lys Pro Ala Ala Pro Gly
 245 250 255
 Gly Gly Arg Ala Ala Gln Leu Lys Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gly Arg
 260 265 270
 Gln Pro Ala Ser Leu Leu Asp Val Arg Ser Val Pro Gly Leu Asp Gly
 275 280 285
 Ser Gly Trp Glu Val Phe Asp Ile Trp Lys Leu Phe Arg Asn Phe Lys
 290 295 300
 Asn Ser Ala Gln Leu Cys Leu Glu Leu Glu Ala Trp Glu Arg Gly Arg
 305 310 315 320
 Ala Val Asp Leu Arg Gly Leu Gly Phe Asp Arg Ala Ala Arg Gln Val
 325 330 335
 His Glu Lys Ala Leu Phe Leu Val Phe Gly Arg Thr Lys Arg Asp
 340 345 350
 Leu Phe Phe Asn Glu Ile Lys Ala Arg Ser Gly Gln Asp Asp Lys Thr
 355 360 365
 Val Tyr Glu Tyr Leu Phe Ser Gln Arg Arg Lys Arg Arg Ala Pro Leu
 370 375 380
 Ala Thr Arg Gln Gly Lys Arg Pro Ser Lys Asn Leu Lys Ala Arg Cys
 385 390 395 400
 Ser Arg Lys Ala Leu His Val Asn Phe Lys Asp Met Gly Trp Asp Asp
 405 410 415
 Trp Ile Ile Ala Pro Leu Glu Tyr Glu Ala Phe His Cys Glu Gly Leu
 420 425 430
 Cys Glu Phe Pro Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn His Ala Val
 435 440 445
 Ile Gln Thr Leu Met Asn Ser Met Asp Pro Glu Ser Thr Pro Pro Thr

- 32 -

450

455

460

Cys Cys Val Pro Thr Arg Leu Ser Pro Ile Ser Ile Leu Phe Ile Asp
465 470 475 480

Ser Ala Asn Asn Val Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met Val Val Glu
485 490 495

Ser Cys Gly Cys Arg
500

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 2703 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: beides
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 (A) ORGANISMUS: Homo sapiens

(ix) MERKMALE:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 (B) LAGE: 640..2142

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

CCATGGCCTC GAAAGGGCAG CGGTGATTTT TTTCACATAA ATATATCGCA CTTAAATGAG	60
TTTAGACAGC ATGACATCAG AGAGTAATTA AATTGGTTTG GGTTGGAATT CCGTTTCCAA	120
TTCCTGAGTT CAGGTTTGTAA AAAGATTTTT CTGAGCACCT GCAGGCCCTGT GAGTGTGTGT	180
GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGA AGTATTTCA CTGGAAAGGA TTCAAAACTA	240
GGGGGAAAAAA AAAACTGGAG CACACAGGCA GCATTACGCC ATTCTTCCTT CTTGGAAAAAA	300
TCCCTCAGCC TTATACAAGC CTCCCTCAAG CCCTCAGTCA GTTGTGCAGG AGAAAGGGGG	360
CGGTTGGCTT TCTCCTTTCA AGAACGAGTT ATTTTCAGCT GCTGACTGGA GACGGTGCAC	420
GTCTGGATAC GAGAGCATT CCACATATGGG ACTGGATACA AACACACACC CGGCAGACTT	480
CAAGAGTCTC AGACTGAGGA GAAAGCCTTT CCTTCTGCTG CTACTGCTGC TGCCGCTGCT	540
TTTGAAAGTC CACTCCTTTC ATGGTTTTTC CTGCCAAACC AGAGGCACCT TTGCTGCTGC	600
CGCTGTTCTC TTTGGTGTCA TTCAGCGGCT GGCCAGAGG ATG AGA CTC CCC AAA	654
Met Arg Leu Pro Lys	
1 5	
CTC CTC ACT TTC TTG CTT TGG TAC CTG GCT TGG CTG GAC CTG GAA TTC	702
Leu Leu Thr Phe Leu Leu Trp Tyr Leu Ala Trp Leu Asp Leu Glu Phe	
10 15 20	
ATC TGC ACT GTG TTG GGT GCC CCT GAC TTG GGC CAG AGA CCC CAG GGG	750
Ile Cys Thr Val Leu Gly Ala Pro Asp Leu Gly Gln Arg Pro Gln Gly	
25 30 35	
ACC AGG CCA GGA TTG GCC AAA GCA GAG GCC AAG GAG AGG CCC CCC CTG	798
Thr Arg Pro Gly Leu Ala Lys Ala Glu Ala Lys Glu Arg Pro Pro Leu	
40 45 50	
GCC CGG AAC GTC TTC AGG CCA GGG GGT CAC AGC TAT GGT GGG GGG GCC	846
Ala Arg Asn Val Phe Arg Pro Gly Gly His Ser Tyr Gly Gly Ala	
55 60 65	

- 34 -

ACC AAT GCC AAT GCC AGG GCA AAG GGA GGC ACC GGG CAG ACA GGA GGC Thr Asn Ala Asn Ala Arg Ala Lys Gly Gly Thr Gly Gln Thr Gly Gly	894
70 75 80 85	
CTG ACA CAG CCC AAG AAG GAT GAA CCC AAA AAG CTG CCC CCC AGA CCG Leu Thr Gln Pro Lys Lys Asp Glu Pro Lys Lys Leu Pro Pro Arg Pro	942
90 95 100	
GGC GGC CCT GAA CCC AAG CCA GGA CAC CCT CCC CAA ACA AGG CAG GCT Gly Gly Pro Glu Pro Lys Pro Gly His Pro Pro Gln Thr Arg Gln Ala	990
105 110 115	
ACA GCC CGG ACT GTG ACC CCA AAA GGA CAG CTT CCC GGA GGC AAG GCA Thr Ala Arg Thr Val Thr Pro Lys Gly Gln Leu Pro Gly Gly Lys Ala	1038
120 125 130	
CCC CCA AAA GCA GGA TCT GTC CCC AGC TCC TTC CTG CTG AAG AAG GCC Pro Pro Lys Ala Gly Ser Val Pro Ser Ser Phe Leu Leu Lys Lys Ala	1086
135 140 145	
AGG GAG CCC GGG CCC CCA CGA GAG CCC AAG GAG CCG TTT CGC CCA CCC Arg Glu Pro Gly Pro Arg Glu Pro Lys Glu Pro Phe Arg Pro Pro	1134
150 155 160 165	
CCC ATC ACA CCC CAC GAG TAC ATG CTC TCG CTG TAC AGG ACG CTG TCC Pro Ile Thr Pro His Glu Tyr Met Leu Ser Leu Tyr Arg Thr Leu Ser	1182
170 175 180	
GAT GCT GAC AGA AAG GGA GGC AAC AGC AGC GTG AAG TTG GAG GCT GGC Asp Ala Asp Arg Lys Gly Gly Asn Ser Ser Val Lys Leu Glu Ala Gly	1230
185 190 195	
CTG GCC AAC ACC ATC ACC AGC TTT ATT GAC AAA GGG CAA GAT GAC CGA Leu Ala Asn Thr Ile Thr Ser Phe Ile Asp Lys Gly Gln Asp Asp Arg	1278
200 205 210	
GGT CCC GTG GTC AGG AAG CAG AGG TAC GTG TTT GAC ATT AGT GCC CTG Gly Pro Val Val Arg Lys Gln Arg Tyr Val Phe Asp Ile Ser Ala Leu	1326
215 220 225	
GAG AAG GAT GGG CTG CTG GGG GCC GAG CTG CGG ATC TTG CGG AAG AAG Glu Lys Asp Gly Leu Leu Gly Ala Glu Leu Arg Ile Leu Arg Lys Lys	1374
230 235 240 245	
CCC TCG GAC ACG GCC AAG CCA GCG GCC CCC GGA GGC GGG CGG GCT GCC Pro Ser Asp Thr Ala Lys Pro Ala Ala Pro Gly Gly Arg Ala Ala	1422
250 255 260	
CAG CTG AAG CTG TCC AGC TGC AGC GGC CGG CAG CCG GCC TCC TTG Gln Leu Lys Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gly Arg Gln Pro Ala Ser Leu	1470
265 270 275	
CTG GAT GTG CGC TCC GTG CCA GGC CTG GAC GGA TCT GGC TGG GAG GTG Leu Asp Val Arg Ser Val Pro Gly Leu Asp Gly Ser Gly Trp Glu Val	1518
280 285 290	
TTC GAC ATC TGG AAG CTC TTC CGA AAC TTT AAG AAC TCG GCC CAG CTG Phe Asp Ile Trp Lys Leu Phe Arg Asn Phe Lys Asn Ser Ala Gln Leu	1566
295 300 305	
TGC CTG GAG CTG GAG GCC TGG GAA CGG GGC AGG GCC GTG GAC CTC CGT	1614

- 35 -

Cys Leu Glu Leu Glu Ala Trp Glu Arg Gly Arg Ala Val Asp Leu Arg	310	315	320	325	
GGC CTG GGC TTC GAC CGC GCC CGG CAG GTC CAC GAG AAG GCC CTG					1662
Gly Leu Gly Phe Asp Arg Ala Ala Arg Gln Val His Glu Lys Ala Leu					
330	335	340			
TTC CTG GTG TTT GGC CGC ACC AAG AAA CGG GAC CTG TTC TTT AAT GAG					1710
Phe Leu Val Phe Gly Arg Thr Lys Lys Arg Asp Leu Phe Phe Asn Glu					
345	350	355			
ATT AAG GCC CGC TCT GGC CAG GAC GAT AAG ACC GTG TAT GAG TAC CTG					1758
Ile Lys Ala Arg Ser Gly Gln Asp Asp Lys Thr Val Tyr Glu Tyr Leu					
360	365	370			
TTC AGC CAG CGG CGA AAA CGG CGG GCC CCA CTG GCC ACT CGC CAG GGC					1806
Phe Ser Gln Arg Arg Lys Arg Arg Ala Pro Leu Ala Thr Arg Gln Gly					
375	380	385			
AAG CGA CCC AGC AAG AAC CTT AAG GCT CGC TGC AGT CGG AAG GCA CTG					1854
Lys Arg Pro Ser Lys Asn Leu Lys Ala Arg Cys Ser Arg Lys Ala Leu					
390	395	400	405		
CAT GTC AAC TTC AAG GAC ATG GGC TGG GAC GAC TGG ATC ATC GCA CCC					1902
His Val Asn Phe Lys Asp Met Gly Trp Asp Asp Trp Ile Ile Ala Pro					
410	415	420			
CTT GAG TAC GAG GCT TTC CAC TGC GAG GGG CTG TGC GAG TTC CCA TTG					1950
Leu Glu Tyr Glu Ala Phe His Cys Glu Gly Leu Cys Glu Phe Pro Leu					
425	430	435			
CGC TCC CAC CTG GAG CCC ACG AAT CAT GCA GTC ATC CAG ACC CTG ATG					1998
Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn His Ala Val Ile Gln Thr Leu Met					
440	445	450			
AAC TCC ATG GAC CCC GAG TCC ACA CCA CCC ACC TGC TGT GTG CCC ACG					2046
Asn Ser Met Asp Pro Glu Ser Thr Pro Pro Thr Cys Cys Val Pro Thr					
455	460	465			
CGG CTG AGT CCC ATC AGC ATC CTC TTC ATT GAC TCT GCC AAC AAC GTG					2094
Arg Leu Ser Pro Ile Ser Ile Leu Phe Ile Asp Ser Ala Asn Asn Val					
470	475	480	485		
GTG TAT AAG CAG TAT GAG GAC ATG GTC GTG GAG TCG TGT GGC TGC AGG					2142
Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met Val Val Glu Ser Cys Gly Cys Arg					
490	495	500			
TAGCAGCACT GGCCCTCTGT CTTCTGGGT GGACATCCC AAGAGCCCT TCCTGCACTC					2202
CTGGAATCAC AGAGGGTCA GGAAGCTGTG GCAGGAGCAT CTACACAGCT TGGGTGAAAG					2262
GGGATTCCAA TAAGCTTGCT CGCTCTCTGA GTGTGACTTG GGCTAAAGGC CCCCTTTAT					2322
CCACAAAGTTC CCCTGGCTGA GGATTGCTGC CCGTCTGCTG ATGTGACCAAG TGGCAGGCAC					2382
AGGTCCAGGG AGACAGACTC TGAATGGGAC TGAGTCCCAG GAAACAGTGC TTTCCGATGA					2442
GAECTCAGCCC ACCATTTCTC CTCACCTGGG CCTTCTCAGC CTCTGGACTC TCCTAACGAC					2502
CTCTCAGGAG AGCCACAGGT GCCACTGCCT CCTCAAATCA CATTGTGCC TGGTGACTTC					2562

- 36 -

CTGTCCCTGG GACAGTTGAG AAGCTGACTG GGCAAGAGTG GGAGAGAAGA GGAGAGGGCT	2622
TGGATAGAGT TGAGGGAGTGT GAGGCTGTTA GACTGTTAGA TTTAAATGTA TATTGATGAG	2682
ATAAAAAGCA AAACTGTGCC T	2703

- 37 -

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 352 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM:
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 - (A) ORGANISMUS: Homo sapiens

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

Met	Thr	Ser	Ser	Leu	Leu	Leu	Ala	Phe	Leu	Leu	Leu	Ala	Pro	Thr	Thr
1				5										10	15
Val	Ala	Thr	Pro	Arg	Ala	Gly	Gly	Gln	Cys	Pro	Ala	Cys	Gly	Gly	Pro
			20					25						30	
Thr	Leu	Glu	Leu	Glu	Ser	Gln	Arg	Glu	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Ala	Lys
					35			40						45	
Arg	Ser	Ile	Leu	Asp	Lys	Leu	His	Leu	Thr	Gln	Arg	Pro	Thr	Leu	Asn
					50			55						60	
Arg	Pro	Val	Ser	Arg	Ala	Ala	Leu	Arg	Thr	Ala	Leu	Gln	His	Leu	His
					65			70						80	
Gly	Val	Pro	Gln	Gly	Ala	Leu	Leu	Glu	Asp	Asn	Arg	Glu	Gln	Glu	Cys
					85			90						95	
Glu	Ile	Ile	Ser	Phe	Ala	Glu	Thr	Gly	Leu	Ser	Thr	Ile	Asn	Gln	Thr
					100				105					110	
Arg	Leu	Asp	Phe	His	Phe	Ser	Ser	Asp	Arg	Thr	Ala	Gly	Asp	Arg	Glu
					115				120					125	
Val	Gln	Gln	Ala	Ser	Leu	Met	Phe	Phe	Val	Gln	Leu	Pro	Ser	Asn	Thr
					130				135					140	
Thr	Trp	Thr	Leu	Lys	Val	Arg	Val	Leu	Val	Leu	Gly	Pro	His	Asn	Thr
					145				150					155	160
Asn	Leu	Thr	Leu	Ala	Thr	Gln	Tyr	Leu	Leu	Glu	Val	Asp	Ala	Ser	Gly
					165				170					175	
Trp	His	Gln	Leu	Pro	Leu	Gly	Pro	Glu	Ala	Gln	Ala	Ala	Cys	Ser	Gln
					180				185					190	
Gly	His	Leu	Thr	Leu	Glu	Leu	Val	Leu	Glu	Gly	Gln	Val	Ala	Gln	Ser
					195				200					205	
Ser	Val	Ile	Leu	Gly	Gly	Ala	Ala	His	Arg	Pro	Phe	Val	Ala	Ala	Arg
					210				215					220	
Val	Arg	Val	Gly	Gly	Lys	His	Gln	Ile	His	Arg	Arg	Gly	Ile	Asp	Cys
					225				230					235	240
Gln	Gly	Gly	Ser	Arg	Met	Cys	Cys	Arg	Gln	Glu	Phe	Phe	Val	Asp	Phe
					245				250					255	

- 38 -

Arg Glu Ile Gly Trp His Asp Trp Ile Ile Gln Pro Glu Gly Tyr Ala
260 265 270

Met Asn Phe Cys Ile Gly Gln Cys Pro Leu His Ile Ala Gly Met Pro
275 280 285

Gly Ile Ala Ala Ser Phe His Thr Ala Val Leu Asn Leu Leu Lys Ala
290 295 300

Asn Thr Ala Ala Gly Thr Thr Gly Gly Ser Cys Cys Val Pro Thr
305 310 315 320

Ala Arg Arg Pro Leu Ser Leu Leu Tyr Tyr Asp Arg Asp Ser Asn Ile
325 330 335

Val Lys Thr Asp Ile Pro Asp Met Val Val Glu Ala Cys Gly Cys Ser
340 345 350

- 39 -

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 352 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM:
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 - (A) ORGANISMUS: Mouse

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met	Ala	Ser	Ser	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Phe	Leu	Thr	Pro	Thr	Thr
1				5								10			15

Val	Val	Asn	Pro	Lys	Thr	Glu	Gly	Pro	Cys	Pro	Ala	Cys	Trp	Gly	Ala
20					25								30		

Ile	Phe	Asp	Leu	Glu	Ser	Gln	Arg	Glu	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Ala	Lys
35					40							45			

Lys	Ser	Ile	Leu	Asp	Lys	Leu	His	Leu	Ser	Gln	Arg	Pro	Ile	Leu	Ser
50					55						60				

Arg	Pro	Val	Ser	Arg	Gly	Ala	Leu	Lys	Thr	Ala	Leu	Gln	Arg	Leu	Arg
65					70				75				80		

Gly	Pro	Arg	Arg	Glu	Thr	Leu	Leu	Glu	His	Asp	Gln	Arg	Gln	Glu	
85					90							95			

Tyr	Glu	Ile	Ile	Ser	Phe	Ala	Asp	Thr	Asp	Leu	Ser	Ser	Ile	Asn	Gln
100					105							110			

Thr	Arg	Leu	Glu	Phe	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Met	Ala	Ser	Gly	Met	Glu
115					120							125			

Val	Arg	Gln	Thr	Arg	Phe	Met	Phe	Phe	Val	Gln	Phe	Pro	His	Asn	Ala
130					135						140				

Thr	Gln	Thr	Met	Asn	Ile	Arg	Val	Leu	Val	Leu	Arg	Pro	Tyr	Asp	Thr
145					150						155			160	

Asn	Leu	Thr	Leu	Thr	Ser	Gln	Tyr	Val	Val	Gln	Val	Asn	Ala	Ser	Gly
165					170							175			

Trp	Tyr	Gln	Leu	Leu	Leu	Gly	Pro	Glu	Ala	Gln	Ala	Ala	Cys	Ser	Gln
180					185							190			

Gly	His	Leu	Thr	Leu	Glu	Leu	Val	Pro	Glu	Ser	Gln	Val	Ala	His	Ser
195					200							205			

Ser	Leu	Ile	Leu	Gly	Trp	Phe	Ser	His	Arg	Pro	Phe	Val	Ala	Ala	Gln
210					215						220				

Val	Arg	Val	Glu	Gly	Lys	His	Arg	Val	Arg	Arg	Gly	Ile	Asp	Cys	
225					230						235			240	

Gln	Gly	Gly	Ser	Arg	Met	Cys	Cys	Arg	Gln	Glu	Phe	Phe	Val	Asp	Phe
245					250						255				

- 40 -

Arg Glu Ile Gly Trp Asn Asp Trp Ile Ile Gln Pro Glu Gly Tyr Ala
260 265 270

Met Asn Phe Cys Thr Gly Gln Cys Pro Leu His Val Ala Gly Met Pro
275 280 285

Gly Ile Ser Ala Ser Phe His Thr Ala Val Leu Asn Leu Leu Lys Ala
290 295 300

Asn Ala Ala Ala Gly Thr Thr Gly Arg Gly Ser Cys Cys Val Pro Thr
305 310 315 320

Ser Arg Arg Pro Leu Ser Leu Leu Tyr Tyr Asp Arg Asp Ser Asn Ile
325 330 335

Val Lys Thr Asp Ile Pro Asp Met Val Val Glu Ala Cys Gly Cys Ser
340 345 350

PATENTANSPRÜCHE

1. Verwendung von biologisch aktivem MP52 oder/und MP121 zur Behandlung oder/und Prävention von Erkrankungen des Nervensystems oder/und zur Behandlung neuropathologischer Situationen, die durch Alterung des Nervensystems verursacht sind.
2. Verwendung nach Anspruch 1 zur Behandlung oder Prävention von Erkrankungen am Auge, insbesondere der neuronalen Schicht der Retina, der Hornhaut, des Sehnervs oder/und anderer Hirnnerven.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß man als biologisch aktiven MP52
 - (a) den reifen Anteil und gegebenenfalls weitere funktionelle Anteile der in SEQ ID NO.1 gezeigten Proteinsequenz;
 - (b) Teile des reifen Proteins, die im wesentlichen dieselbe Aktivität aufweisen;
 - (c) reife Proteine mit verändertem N-Terminus, welche im wesentlichen dieselbe Aktivität aufweisen;
 - (d) ein reifes Protein oder Teile davon, welches aufgrund seiner Abstammung aus anderen Wirbeltieren Abweichung in der Aminosäuresequenz aufweist, jedoch im wesentlichen dieselbe Aktivität beibehält;verwendet.
4. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß man als biologisch aktiven MP121
 - (a) den reifen Anteil und gegebenenfalls weitere funktionelle Anteile der in SEQ ID NO.3 oder 4 gezeigten Proteinsequenz;

- 42 -

- (b) Teile des reifen Proteins, die im wesentlichen dieselbe Aktivität aufweisen;
- (c) reife Proteine mit verändertem N-Terminus, welche im wesentlichen dieselbe Aktivität aufweisen;
- (d) ein reifes Protein oder Teile davon, welches aufgrund seiner Abstammung aus anderen Wirbeltieren Abweichung in der Aminosäuresequenz aufweist, jedoch im wesentlichen dieselbe Aktivität beibehält; verwendet.

5. Verwendung nach Anspruch 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß man ein Fusionsprotein aus biologisch aktivem MP52 oder MP121 oder Teilen hiervon und einem anderen Protein aus der Superfamilie von Proteinen mit "Cystine Knot Motif" oder Teilen hiervon verwendet.

6. Verwendung nach Anspruch 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß man als biologisch aktiven MP52 oder MP121 ein Heterodimer aus einem biologisch aktiven MP52 oder MP121 und einem Monomer eines anderen Proteins aus der Superfamilie der Proteine mit "Cystine Knot Motif" verwendet.

7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß man zusätzlich natürlich vorkommende Ganglioside, deren Derivate, Salze oder künstliche Analoga verabreicht.

8. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß man zusätzlich ein Protein aus der Superfamilie der Proteine mit "Cystine Knot Motif" verabreicht.

9. Verwendung nach einem der Ansprüche 5, 6 oder 8, **dadurch gekennzeichnet**,

daß es sich bei dem Protein aus der Superfamilie mit "Cystine Knot Motif" um ein Protein aus der TGF- β -Superfamilie, NGF-/Neurotrophin-Familie oder PDGF-Familie handelt.

10. Verwendung nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß es sich um TGF- β -, BMP-, Aktivin-, GDNF-, NGF-, BDNF-, NT3- oder NT4/5-Proteine handelt.
11. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß man zusätzlich einen Wachstumsfaktor wie FGF, EGF oder Glial Growth Factor verabreicht.
12. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß man intrazerebral, oral, durch Injektion, durch Inhalation oder als lokale, äußerliche Anwendung verabreicht.
13. Verwendung von biologisch aktivem MP52 oder/und MP121 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung oder/und Prävention von Erkrankungen des Nervensystems oder/und zur Behandlung neuropathologischer Situationen, die durch Alterung des Nervensystems verursacht sind.
14. Verwendung nach Anspruch 13 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung oder Prävention von Erkrankungen am Auge, insbesondere der neuronalen Schicht der Retina, der Hornhaut, des Sehnervs oder/und anderer Hirnnerven.
15. Verwendung nach Anspruch 13 oder 14,
dadurch gekennzeichnet,
daß man als biologisch aktiven MP52
 - (a) den reifen Anteil und gegebenenfalls weitere funktionelle Anteile der in SEQ ID NO.1 gezeigten Proteinsequenz;

- 44 -

- (b) Teile des reifen Proteins enthält, die im wesentlichen dieselbe Aktivität aufweisen;
- (c) reife Proteine mit verändertem N-Terminus, welche im wesentlichen dieselbe Aktivität aufweisen;
- (d) ein reifes Protein oder Teile davon, welches aufgrund seiner Abstammung aus anderen Wirbeltieren Abweichung in der Aminosäuresequenz aufweist, jedoch im wesentlichen dieselbe Aktivität beibehält; verwendet.

16. Verwendung nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, daß man als biologisch aktiven MP121

- (a) den reifen Anteil und gegebenenfalls weitere funktionelle Anteile der in SEQ ID NO.3 oder 4 gezeigten Proteinsequenz;
- (b) Teile des reifen Proteins enthält, die im wesentlichen dieselbe Aktivität aufweisen;
- (c) reife Proteine mit verändertem N-Terminus, welche im wesentlichen dieselbe Aktivität aufweisen;
- (d) ein reifes Protein oder Teile davon, welches aufgrund seiner Abstammung aus anderen Wirbeltieren Abweichung in der Aminosäuresequenz aufweist, jedoch im wesentlichen dieselbe Aktivität beibehält; verwendet.

17. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Fusionsprotein aus biologisch aktivem MP52 oder MP121 oder Teilen hiervon und einem anderen Protein aus der Superfamilie von Proteinen mit "Cystine Knot Motif" oder Teilen hiervon verwendet.

18. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß man als biologisch aktiven MP52 oder MP121 ein Heterodimer aus einem biologisch aktiven MP52 bzw. MP121

- 45 -

und einem Monomer eines anderen Proteins aus der Superfamilie der Proteine mit "Cystine Knot Motif" verwendet.

19. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß man zusätzlich natürlich vorkommende Ganglioside, deren Derivate, Salze oder künstliche Analoga zusetzt.
20. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich ein Protein aus der Superfamilie der Proteine mit "Cystine Knot Motif" zugesetzt wird.
21. Verwendung nach einem der Ansprüche 17, 18 oder 20, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Protein aus der Superfamilie mit "Cystine Knot Motif" um ein Protein aus der TGF- β -Superfamilie, NGF-/Neurotrophin-Familie oder PDGF-Familie handelt.
22. Verwendung nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um TGF- β -, BMP-, Aktivin-, GDNF-, NGF-, BDNF-, NT3- oder NT4/5-Proteine handelt.
23. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß man zusätzlich einen Wachstumsfaktor wie FGF, EGF oder Glial Growth Factor verabreicht.
24. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß man intrazerebral, oral, durch Injektion, durch Inhalation, als lokale, äußerliche Anwendung verabreicht.
25. Fusionsprotein, dadurch gekennzeichnet,

- 46 -

daß es zumindest Teile des reifen Anteils der in SEQ ID NO.1 gezeigten Sequenz von MP52 sowie mindestens Teile eines anderen Proteins aus der Superfamilie der Proteine mit "Cystine Knot Motif" enthält.

26. Fusionsprotein gemäß Anspruch 25,

dadurch gekennzeichnet,

daß es

- (a) den gesamten reifen Proteinanteil aus SEQ ID NO.1 sowie gegebenenfalls weitere funktionelle Anteile der in SEQ ID NO.1 gezeigten Proteinsequenz;
- (b) den reifen Anteil der in SEQ ID NO.1 gezeigten Proteinsequenz, jedoch mit verändertem N-Terminus, bevorzugt einem vorangestellten Methionin; oder
- (c) den reifen Anteil der in SEQ ID NO.1 gezeigten Proteinsequenz oder Teile davon, welche aufgrund ihrer Herkunft aus anderen Wirbeltieren Abweichungen aufweist, jedoch im wesentlichen die gleiche Aktivität beibehält,

enthält.

27. Heterodimeres Protein,

dadurch gekennzeichnet,

daß es mindestens einen Teil der in SEQ ID NO.1 gezeigten Sequenz des reifen MP52-Proteins als ein Monomer sowie ein zweites Monomer eines anderen Proteins aus der Superfamilie der Proteine mit "Cystine Knot Motif" enthält.

28. Heterodimeres Protein nach Anspruch 27,

dadurch gekennzeichnet,

daß es

- (a) den gesamten reifen Proteinanteil aus SEQ ID NO.1 sowie gegebenenfalls weitere funktionelle Anteile der in SEQ ID NO.1 gezeigten Proteinsequenz;
- (b) den reifen Anteil der in SEQ ID NO.1 gezeigten Proteinsequenz, jedoch mit verändertem N-Terminus, bevorzugt einem vorangestellten Methionin; oder

- 47 -

(c) den reifen Anteil der in SEQ ID NO.1 gezeigten Proteinsequenz oder Teile davon, welche aufgrund ihrer Herkunft aus anderen Wirbeltieren Abweichungen aufweist, jedoch im wesentlichen die gleiche Aktivität beibehält, enthält.

29. Arzneimittel zur Behandlung oder/und Prävention von Erkrankungen des Nervensystems oder/und zur Behandlung neuropathologischer Situationen, die durch Alterung des Nervensystems verursacht sind, enthaltend biologisch aktiven MP52 oder/und MP121 als Wirkstoff.

30. Arzneimittel nach Anspruch 29 zur Behandlung oder Prävention von Erkrankungen am Auge, insbesondere der neuronalen Schicht der Retina, der Hornhaut, des Sehnervs oder/und anderer Hirnnerven.

31. Arzneimittel nach Anspruch 29 oder 30, dadurch gekennzeichnet, daß es als biologisch aktiven MP52

- (a) den reifen Anteil und gegebenenfalls weitere funktionelle Anteile der in SEQ ID NO.1 gezeigten Proteinsequenz;
- (b) Teile des reifen Proteins, die im wesentlichen dieselbe Aktivität aufweisen;
- (c) reife Proteine mit verändertem N-Terminus, welche im wesentlichen dieselbe Aktivität aufweisen;
- (d) ein reifes Protein oder Teile davon, welches aufgrund seiner Abstammung aus anderen Wirbeltieren Abweichung in der Aminosäuresequenz aufweist, jedoch im wesentlichen dieselbe Aktivität beibehält; enthält.

32. Arzneimittel nach Anspruch 29 oder 30, dadurch gekennzeichnet, daß es als biologisch aktiven MP121

- 48 -

- (a) den reifen Anteil und gegebenenfalls weitere funktionelle Anteile der in SEQ ID NO.3 oder 4 gezeigten Proteinsequenz;
- (b) Teile des reifen Proteins, die im wesentlichen dieselbe Aktivität aufweisen;
- (c) reife Proteine mit verändertem N-Terminus, welche im wesentlichen dieselbe Aktivität aufweisen;
- (d) ein reifes Protein oder Teile davon, welches aufgrund seiner Abstammung aus anderen Wirbeltieren Abweichung in der Aminosäuresequenz aufweist, jedoch im wesentlichen dieselbe Aktivität beibehält; enthält.

33. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 29 bis 32, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Fusionsprotein aus biologisch aktivem MP52 oder MP121 oder Teilen hiervon und einem anderen Protein aus der Superfamilie von Proteinen mit "Cystine Knot Motif" oder Teilen hiervon enthält.

34. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 29 bis 32, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Heterodimer aus einem biologisch aktiven MP52 oder MP121 und einem Monomer eines anderen Proteins aus der Superfamilie der Proteine mit "Cystine Knot Motif" enthält.

35. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 29 bis 34, dadurch gekennzeichnet, daß es zusätzlich natürlich vorkommende Ganglioside, deren Derivate, Salze oder künstliche Analoga enthält.

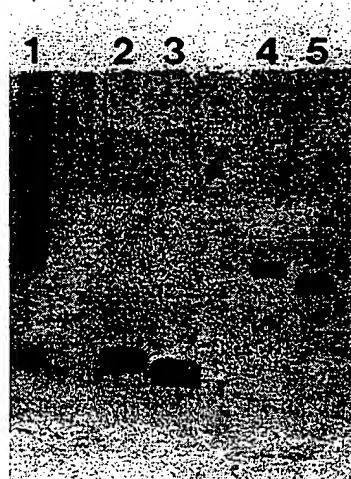
36. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 29 bis 35, dadurch gekennzeichnet, daß man gegebenenfalls geeignete Träger-, Hilfs-, Verdünns- oder Füllstoffe zusetzt.

- 49 -

37. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 29 bis 36,
dadurch gekennzeichnet,
daß es zusätzlich ein Protein aus der Superfamilie der
Proteine mit "Cystine Knot Motif" enthält.
38. Arzneimittel nach Anspruch 33, 34 oder 37,
dadurch gekennzeichnet,
daß es sich bei dem Protein aus der Superfamilie mit
"Cystine Knot Motif" um ein Protein aus der TGF- β -Super-
familie, NGF-/Neurotrophin-Familie oder PDGF-Familie han-
delt.
39. Arzneimittel nach Anspruch 38,
dadurch gekennzeichnet,
daß es sich um TGF- β -, BMP-, Aktivin-, GDNF-, NGF-,
BDNF-, NT3- oder NT4/5-Proteine handelt.
40. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 29 bis 39,
dadurch gekennzeichnet,
daß es zusätzlich einen Wachstumsfaktor wie FGF, EGF oder
Glial Growth Factor enthält.
41. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 29 bis 39, das zur
intrazerebralen, oralen, lokalen äußeren Anwendung oder
zur Anwendung per Injektion oder Inhalation konfektio-
niert ist.

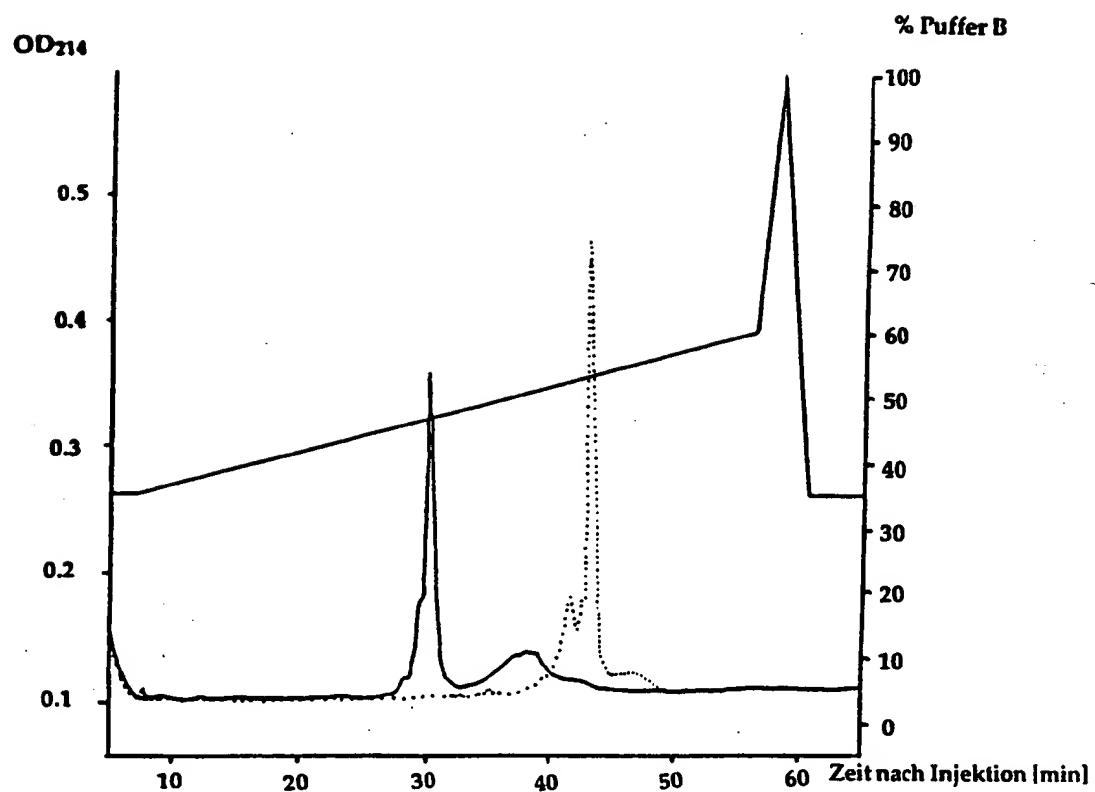
1 / 7

Fig.1



2/7

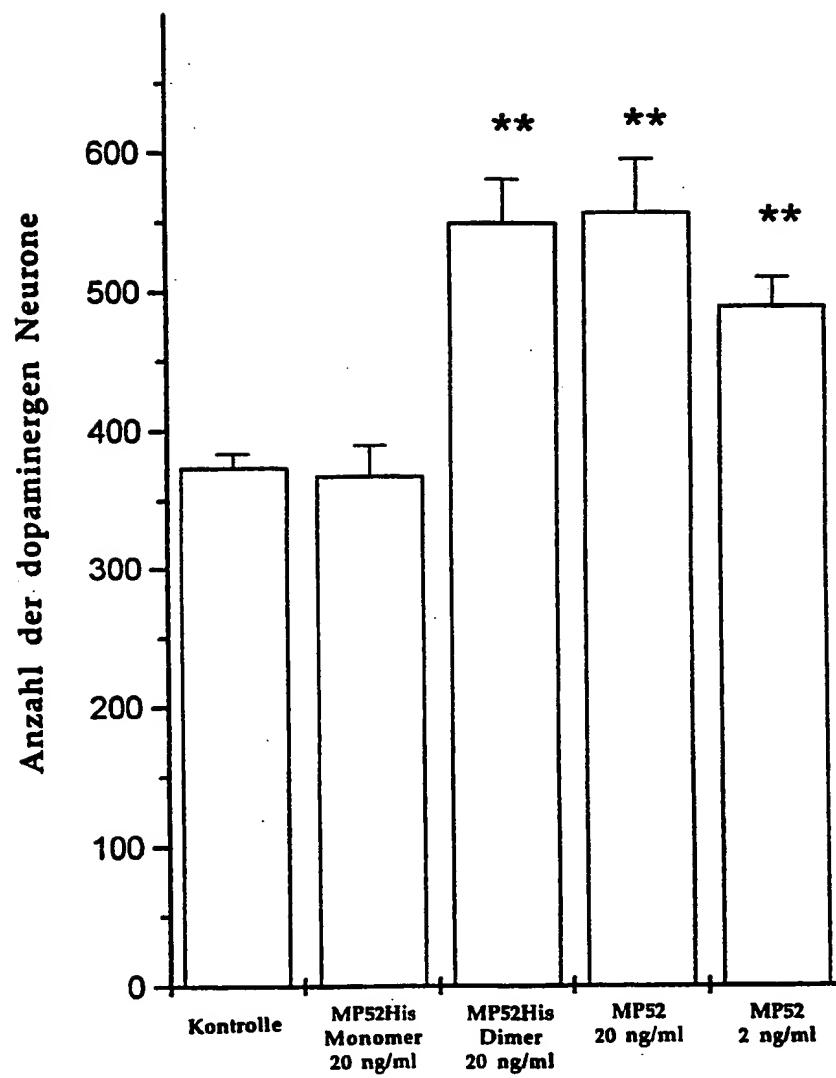
Fig. 2



ERSATZBLATT (REGEL 26)

3 / 7

Fig. 3



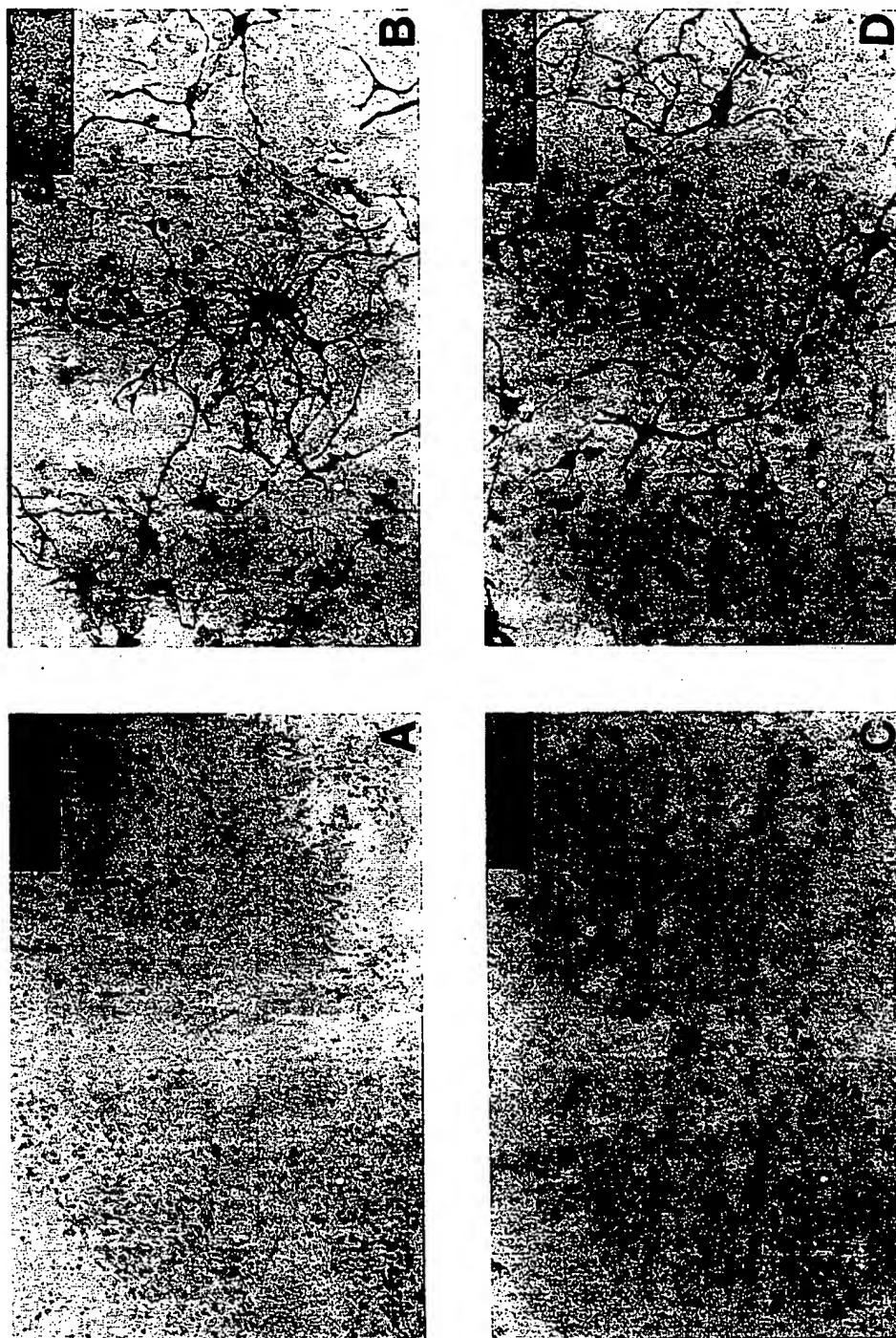


Fig. 4

ERSATZBLATT (REGEL 26)

5 / 7

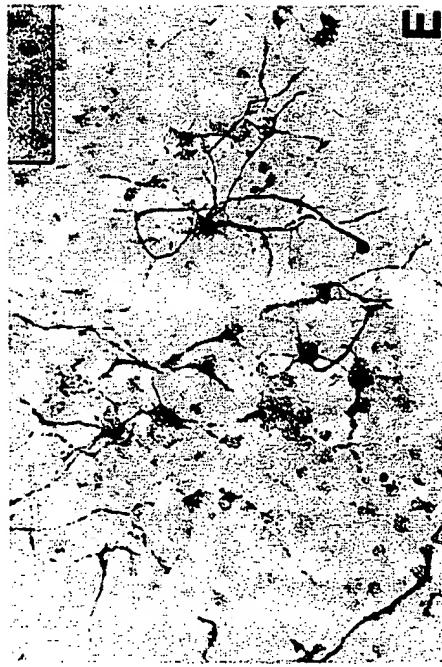
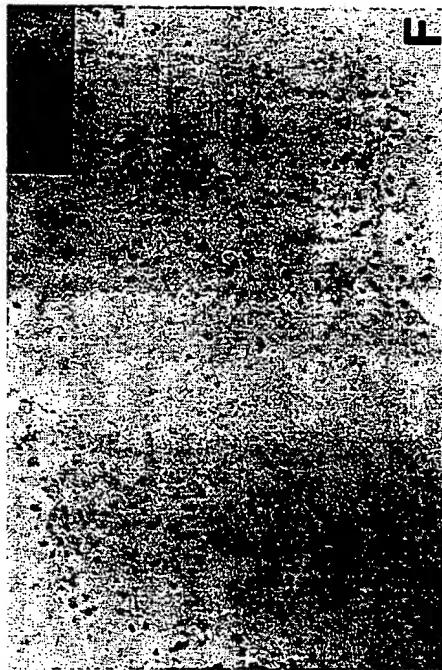
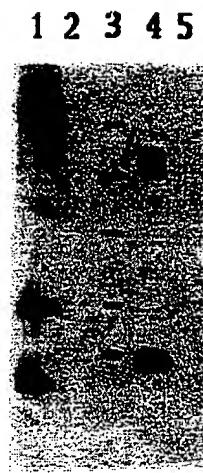


Fig. 4

6 / 7

Fig. 5



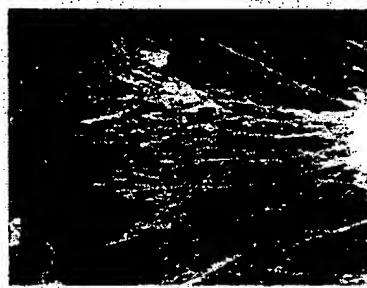
7 / 7

Fig. 6

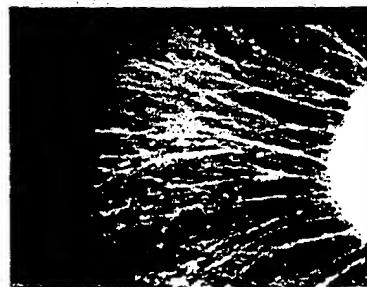
A



B



C



PCT

WELTOORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶:</p> <p>C12N 15/12, C07K 14/495, A61K 38/18</p>		A3	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/03188</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 30. Januar 1997 (30.01.97)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/03065</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 12. Juli 1996 (12.07.96)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 195 25 416.3 12. Juli 1995 (12.07.95) DE</p> <p>(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): BIO-PHARM GESELLSCHAFT ZUR BIOTECHNOLOGISCHEN ENTWICKLUNG VON PHARMAKA MBH [DE/DE]; Czernyring 22, D-69115 Heidelberg (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): HÖTTEN, Gertrud [DE/DE]; Weihwiesenweg 17, D-69245 Bammental (DE). POHL, Jens [DE/DE]; Kellerswiesen 3, D-76707 Hambrücken (DE). BECHTOLD, Rolf [DE/DE]; Carl-Zuckmayer-Strasse 21, D-69126 Heidelberg (DE). PAULISTA, Michael [DE/DE]; Wingertstrasse 10, D-69181 Leimen (DE). UNSICKER, Klaus [DE/DE]; Köpfelweg 54, D-69118 Heidelberg (DE).</p> <p>(74) Anwälte: WEICKMANN, H., Fincke usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, AR IPO Patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p> <p>(86) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 27. Februar 1997 (27.02.97)</p>	
<p>(54) Title: USE OF MP52 OR MP121 FOR TREATING AND PREVENTING DISEASES OF THE NERVOUS SYSTEM</p> <p>(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON MP52 ODER MP121 ZUR BEHANDLUNG UND PRÄVENTION VON ERKRANKUNGEN DES NERVENSYSTEMS</p> <p>(57) Abstract</p> <p>Disclosed is the use of biologically active MP52 and/or MP121 for treating and preventing diseases of the nervous system and/or for treating neuropathological states caused by ageing of the nervous system. The disclosed medicament for treating and preventing diseases of the nervous system and/or for treating neuropathological states caused by ageing of the nervous system therefore contains biologically active MP52 and/or MP121 as active substances.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von biologisch aktivem MP52 oder/und MP121 zur Behandlung und Prävention von Erkrankungen des Nervensystems oder/und zur Behandlung neuropathologischer Situationen, die durch Alterung des Nervensystems verursacht sind. Ein erfindungsgemäßes Arzneimittel zur Behandlung und Prävention von Erkrankungen des Nervensystems oder/und zur Behandlung neuropathologischer Situationen, die durch Alterung des Nervensystems verursacht sind, enthält daher biologisch aktiven MP52 oder/und MP121 als Wirkstoff.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estonia	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Madagaskar	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 96/03065

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/12 C07K14/495 A61K38/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 93 16099 A (BIOPHARM GES ZUR BIOTECHNOLOGISCHEN ENTWICKLUNG VON PHARMAKA) 19 August 1993 cited in the application see the whole document ---	1-41
A	WO 95 04819 A (BIOPHARM GES ZUR BIOTECHNOLOGISCHEN ENTWICKLUNG VON PHARMAKA) 16 February 1995 cited in the application see the whole document ---	1-41
P,A	WO 96 01316 A (BIOPHARM GES ZUR BIOTECHNOLOGISCHEN ENTWICKLUNG VON PHARMAKA) 18 January 1996 cited in the application see the whole document -----	1-41



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *'E' earlier document but published on or after the international filing date
- *'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

*'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

*'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

*'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

*'&' document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search

13 January 1997

Date of mailing of the international search report

17.01.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreau, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP96/03065

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 1-12
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 1-12 relate to a method of treating the human or animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 96/03065

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9316099	19-08-93	AU-A-	3497193	03-09-93
		CA-A-	2129820	19-08-93
		CZ-A-	9401942	18-10-95
		EP-A-	0625989	30-11-94
		HU-A-	67683	28-04-95
		JP-T-	7503847	27-04-95
		NZ-A-	249113	26-07-96
<hr/>				
WO-A-9504819	16-02-95	DE-A-	4420157	23-02-95
		AU-A-	7498694	28-02-95
		CA-A-	2169171	16-02-95
		CN-A-	1129013	14-08-96
		CZ-A-	9600357	17-07-96
		EP-A-	0713529	29-05-96
		ZA-A-	9405992	14-03-95
<hr/>				
WO-A-9601316	18-01-96	DE-A-	19511243	04-01-96
		AU-A-	2979895	25-01-96
		ZA-A-	9505444	14-02-96
<hr/>				

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 96/03065

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N15/12 C07K14/495 A61K38/18

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprästoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprästoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 93 16099 A (BIOPHARM GES ZUR BIOTECHNOLOGISCHEN ENTWICKLUNG VON PHARMAKA) 19.August 1993 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-41
A	WO 95 04819 A (BIOPHARM GES ZUR BIOTECHNOLOGISCHEN ENTWICKLUNG VON PHARMAKA) 16.Februar 1995 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-41
P,A	WO 96 01316 A (BIOPHARM GES ZUR BIOTECHNOLOGISCHEN ENTWICKLUNG VON PHARMAKA) 18.Januar 1996 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument -----	1-41

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- *'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

1

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
13.Januar 1997	17.01.97

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Td. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+ 31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Moreau, J
--	--

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

I - nationales Aktenzeichen

PCT/EP 96/03065

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr. 1-12
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Bemerkung: Obwohl die Ansprüche 1-12 sich auf ein V erfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbinung/Zusammensetzung.
2. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
 Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 96/03065

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO-A-9316099	19-08-93	AU-A-	3497193	03-09-93
		CA-A-	2129820	19-08-93
		CZ-A-	9401942	18-10-95
		EP-A-	0625989	30-11-94
		HU-A-	67683	28-04-95
		JP-T-	7503847	27-04-95
		NZ-A-	249113	26-07-96
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-9504819	16-02-95	DE-A-	4420157	23-02-95
		AU-A-	7498694	28-02-95
		CA-A-	2169171	16-02-95
		CN-A-	1129013	14-08-96
		CZ-A-	9600357	17-07-96
		EP-A-	0713529	29-05-96
		ZA-A-	9405992	14-03-95
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-9601316	18-01-96	DE-A-	19511243	04-01-96
		AU-A-	2979895	25-01-96
		ZA-A-	9505444	14-02-96
-----	-----	-----	-----	-----